

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1
U. E. R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1976 - N° 127

**Recherche et Essai d'Identification
par Microscopie en Contraste de Phase
des AMIBES LIBRES des Piscines Lyonnaises**

**Etude de la Pathogénicité
des Souches de Naegleria sp. et d'Acanthamoeba sp. isolées**

THESE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON 1

et soutenue publiquement le 3 Décembre 1976

pour obtenir le grade de Docteur d'Etat en Pharmacie

par

Pierre PERNIN

né le 30 Octobre 1946

à LYON 4° (Rhône)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553606_0016

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1
U. E. R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1976 - N° 127

**Recherche et Essai d'Identification
par Microscopie en Contraste de Phase
des AMIBES LIBRES des Piscines Lyonnaises**

**Etude de la Pathogénicité
des Souches de Naegleria sp. et d'Acanthamoeba sp. isolées**

THESE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON 1

et soutenue publiquement le 3 Décembre 1976

pour obtenir le grade de Docteur d'Etat en Pharmacie

par

Pierre PERNIN

né le 30 Octobre 1946

à LYON 4° (Rhône)

Année 1974 - 1975

Recherche en Chimie Thérapeutique
par Microscopie en Contraste de Phase
des cellules vivantes des tumeurs lymphomateuses

Travaux de la thèse de
des Sciences de la Vie et de la Santé
de la Faculté des Sciences de la Vie et de la Santé



à l'Université Claude-Bernard - LYON 1
et soutenu publiquement le 2 Décembre 1975
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

Présenté par
M. P. P. P. P.
M. P. P. P. P.

Université Claude Bernard Lyon I

Président : Monsieur le Professeur D. Germain

Premier Vice-Président : Monsieur le Professeur Elbaz

Deuxième Vice-Président : Monsieur P. Poncet, Maître-Assistant

Troisième Vice-Président : Monsieur C. Bador, Etudiant

Secrétaire Général : Monsieur J. Rambaud, Administrateur Civil

Unités d'Enseignement et de Recherche (UER)

UER Médicale Grange-Blanche : Monsieur le Docteur B. Salle, MCA

UER Médicale Alexis-Carrel : Monsieur le Professeur C. Girod

UER Médicale Lyon-Nord : Monsieur le Professeur J.P. Garin

UER Médicale Sud-Ouest : Monsieur le Professeur J. Robert

UER des Sciences Pharmaceutiques : Monsieur le Professeur L. Oddoux

UER des Techniques de Réadaptation : Monsieur A. Morgon, MCA

UER de Biologie Humaine : Monsieur le Professeur J.C. Czyba

UER d'Education Physique et Sportive : Monsieur A. Millon, Professeur d'EPS

UER des Sciences Odontologiques : Monsieur le Docteur R. Vincent

UER de Mathématiques : Monsieur le Professeur G. Maury

UER de Physique : Monsieur le Professeur R. Uzan

UER de Chimie et Biochimie : Monsieur le Professeur J. Huet

UER des Sciences de la Nature : Monsieur le Professeur J. Brun

UER des Sciences Physiologiques : Monsieur R. Fontanges, MCA

UER de Physique Nucléaire : Monsieur le Professeur A. Sarazin

UER de Mécanique : Monsieur le Professeur J. Mathieu

IUT 1 : Monsieur le Professeur B. Pouyet

IUT 2 : Monsieur J. Gallet, Directeur ENSAM

Observatoire de Lyon : Monsieur le Professeur J.H. Bigay

A Marie - France ,

à Emmanuel et Charles ,

à la mémoire de ma Mère ,

à mon Père ,

à mes beaux-parents ,

A tous mes Amis ...

A notre Président de Thèse ,

Monsieur le Professeur J. Coudert ,

Il nous accueillit dans son Laboratoire
à une époque où nous hésitions dans notre choix.
Pour nous renforcer dans notre option,
il nous confia le sujet de cette Thèse,
manifestant par là son désir de voir les pharmaciens
prendre en charge les problèmes de l'environnement.

Nous sommes très honoré de sa confiance
dont nous le remercions ,

Que ce travail soit
Le témoignage de notre reconnaissance .

A nos Juges :

Monsieur le Professeur J.P. Garin ,

malgré les charges administratives qu'il assume depuis deux ans, il nous a toujours accueilli et écouté.

Il n'a pas craint de nous stimuler de temps à autre pour nous inciter à accélérer la rédaction de ce travail.

Nous le remercions ici de ses manifestations d'attention et le prions de croire à notre sincère attachement.

Monsieur le Professeur L. Oddoux ,

Il s'est toujours montré disponible pour nous guider dans nos démarches administratives.

Nous lui sommes reconnaissant d'avoir su se libérer de ses charges de Directeur d'UER pour accepter de siéger dans ce Jury.

Nous l'en remercions et le prions de trouver ici le gage de notre gratitude.

Monsieur le Professeur J. Terraillon ,

dont l'âme de bactériologiste s'intriguera peut-être de ces amibes bactériophages ?

Nous espérons cependant qu'il ne sera pas trop déçu par ce peu que nous savons sur elles.

Nous sommes très honoré qu'il ait accepté de siéger dans ce Jury,

et nous l'en remercions.

Monsieur M. Pussard ,
Maître de Recherche à l'INRA ,

Les quelques jours trop brefs que nous avons passés
dans son Laboratoire, nous ont permis d'apprécier
la haute qualité de ses recherches et la grande rigueur de
son esprit scientifique.

Toujours prêt à nous écouter ou à nous accueillir,
il n'a cessé de nous encourager, de nous conseiller, et même
de nous aider à travailler sur certaines souches.

Nous voudrions lui exprimer ici toute notre gratitude
et notre reconnaissance,

En espérant pouvoir continuer à bénéficier dans l'avenir,
de sa haute compétence dans le domaine des Protozoaires.

A tous ceux et celles qui nous ont aidé
à la réalisation pratique des résultats présentés
dans cette Thèse ,

Mademoiselle le Docteur M. Mojon ,

qui nous a soutenu et encouragé efficacement depuis le début
de nos recherches. Elle a bien voulu nous faire profiter de ses conseils
dans la réalisation de ces pages,

et nous l'en remercions sincèrement.

Monsieur le Docteur Molet ,

de l'Institut de Parasitologie de Strasbourg ,

qui nous a si utilement guidé dans les choix techniques
au tout début de ce travail.

Madame A.M. Grollier - Bérard

et Mademoiselle C. Cuilleret ,

qui se sont succédées pour nous assister avec efficacité
dans la monotone routine quotidienne de l'entretien de nos souches.

Madame G. Bayle - Martinière et Mademoiselle M.F. Monier ,

qui, toujours, ont accepté avec amabilité et gentillesse
de faire les inclusions, les coupes et les colorations que nous leur deman-
dions.

Madame C. Liou ,

qui mit à notre disposition,
avec une humeur toujours égale et souriante,
ses talents de documentaliste.

A Tous nos Amis et Collègues

du Laboratoire de Parasitologie .

Introduction

Après les travaux de Schaudinn qui, en 1903 (200), reconnaissait à *Entamoeba histolytica* le triste privilège d'être la seule amibe pathogène de l'homme, peu de chercheurs dans le domaine médical s'étaient intéressés aux amibes dites "libres". Il a fallu la publication de Fowler et Carter en 1965 (86) pour attirer à nouveau l'attention sur ces protozoaires et se rappeler que, quelques années auparavant en 1958 et en 1959, Culbertson & Coll.(52,53) avaient montré expérimentalement leur pouvoir pathogène.

Depuis, les publications de cas humains de méningoencéphalite amibienne primitive se sont multipliées, le rôle de l'eau douce comme réservoir de germes a été découvert. Dès lors plusieurs équipes de chercheurs se sont attachées à l'étude de ces nouveaux agents pathogènes.

Conscient de l'intérêt d'une telle étude du danger potentiel que représentent ces amibes, le directeur du Bureau d'Hygiène de la Ville de Lyon, Monsieur le Docteur Violet, a bien voulu charger le Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon - Professeur J. Coudert - d'entreprendre une enquête sur l'ensemble des piscines de Lyon. Le Professeur J. Coudert nous a confié ce travail qui fait l'objet de notre Thèse. Le sujet s'est révélé si vaste et si complexe, ne serait-ce qu'en ce qui concerne la taxonomie de ces rhizopodes, que nous ne rapporterons ici que les premiers résultats de nos travaux.

Nous avons réservé, dans une première partie, un chapitre sur le point de vue médical, afin de bien situer l'intérêt de nos recherches, le second chapitre étant consacré à une revue de la littérature concernant les moyens d'identification des amibes libres. Cette première partie recommande les mesures prophylactiques proposées par l'école Belge et, d'autre part, souligne la nécessité d'établir une systématique claire de ces Protozoaires encore assez mal connus.

En raison des buts que nous nous étions assignés, nous avons donc insisté plus spécialement sur les caractères cellulaires et biologiques tels qu'ils peuvent être étudiés au microscope en contraste de phase. Nous terminons sur une des classifications proposées actuellement, remarquant qu'elle ne peut être, en l'état actuel de nos connaissances, que provisoire.

La seconde partie de notre Thèse est réservée à nos travaux personnels. Nous exposons les méthodes que nous avons utilisées pour isoler et étudier ces amibes. Nous donnons ensuite une analyse qualitative et une approche quantitative de nos prélèvements dans les différentes piscines de l'agglomération lyonnaise quant aux amibes libres qu'ils contenaient, ainsi que les premiers résultats obtenus sur l'étude du pouvoir pathogène expérimental. Enfin, plusieurs des souches que nous avons isolées font l'objet d'une étude spéciale au cours de laquelle nous nous sommes attaché surtout aux phénomènes mitotiques.

Chapitre I

Aperçu général sur la Méningo - encéphalite Amibienne Primitive

Historique.

Il y a sans doute peu d'exemples dans l'Histoire de la Médecine, où l'induction expérimentale d'une maladie à partir d'un agent pathogène jusqu'alors insoupçonné, ait précédé son observation sur le plan clinique.

C'est bien grâce à l'intuition de Culbertson & Coll. (62,63) que l'on peut aujourd'hui individualiser le syndrome de méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP). Ces auteurs inoculent par voie intracérébrale à des singes et des souris, des cultures de rein de singe contaminées, pensent-ils, par un virus inconnu. Tous les animaux meurent. L'étude post-mortem des cerveaux met en évidence la présence d'amibes. A la suite de ces premiers essais, la Souris se révèle particulièrement sensible à la voie d'introduction nasale qui provoque non seulement une atteinte du cerveau, mais aussi un envahissement généralisé de l'organisme.

Culbertson rapporte cette amibe au genre *Acanthamoeba*. Singh et Das, plus tard (216), en feront une nouvelle espèce : *Acanthamoeba culbertsoni*. En 1958, Culbertson venait de découvrir un nouvel agent pathogène et une nouvelle maladie. Dès 1965, ce même auteur suggère la possibilité d'une invasion similaire du système nerveux central chez l'homme, la contamination se faisant par voie nasale (64).

Ce qui n'était qu'une prémonition se trouve malheureusement confirmé la même année, quand deux Australiens, Fowler et Carter (86) découvrent une forme d'amibe "inhabituelle" à l'autopsie de quatre malades décédés de méningite aiguë. Ils établissent aussitôt un rapprochement avec les constatations de Culbertson et attribuent ces cas de méningite à *Acanthamoeba*.

Dès lors, les cas rapportés vont se multiplier rapidement. Patras et Andujar en 1966 (163) rapportent un cas d'évolution lente, dont

le diagnostic est également fait post-mortem. La même année, Butt (26) signale trois cas survenus en Floride. A cette occasion, il attribue l'origine probable de la contamination à une baignade et, surtout, il observe pour la première fois les amibes dans le liquide céphalorachidien (L.C.R.) des malades, sans toutefois parvenir à les isoler. Butt propose la dénomination de méningo-encéphalite amibienne primitive pour ce nouveau syndrome. Ce n'est qu'en 1968 que Butt, Baro et Knorr (27) parviennent à isoler et cultiver les amibes responsables, à partir du L.C.R. d'un quatrième cas. Ces auteurs d'une part, Culbertson d'autre part (67), identifient la souche isolée à un genre jusqu'alors inconnu en médecine et très différent du genre *Acanthamoeba* : il s'agit du genre *Naegleria*.

Carter (32,34), à son tour, réussit à cultiver les amibes isolées des sixième et septième cas australiens. Il confirme leur appartenance au genre *Naegleria* et crée même une nouvelle espèce *Naegleria fowleri*.

A la même époque, Callicott (29), dont l'attention vient d'être attirée par un nouveau cas, fait rétrospectivement sur les coupes anatomopathologiques, le diagnostic de six cas de M.E.A.P. survenus au cours de petites épidémies pendant les étés 1951 et 1952 près de Richmond (Virginie). Il entreprend alors une enquête systématique (30) portant sur 390 échantillons de L.C.R., ce qui lui permet de découvrir deux nouveaux cas dont l'un serait dû à *Acanthamoeba*.

Toujours en Virginie, Duma & Coll. (78,80) à quatre reprises isolent *Naegleria* dans le L.C.R. et observent, chez un malade, une dissémination hématogène ; tandis que Dos Santos (77), grâce à l'étude de 16.174 rapports d'autopsie, retrouve cinq autres cas.

Mais l'Europe n'est pas épargnée et d'autres méningo-encéphalites amibiennes primitives tout aussi foudroyantes sont découvertes plus près de nous.

Les premiers cas européens sont signalés en 1968 par Cerva (42, 43). Il s'agit de seize cas de méningite survenus à Usti, en Bohême, sous forme de petites épidémies répétées, au cours des années 1962, 1963, 1964 et 1965. Le diagnostic étiologique n'avait pu être fait pour aucun d'entre eux. Cerva, grâce à un examen histologique soigneux, découvre les amibes 2 à 5 ans après le décès des malades. L'enquête épidémiologique révèle pour tous ces sujets, un point commun : ils ont fréquenté la même piscine les

jours précédant leur hospitalisation.

Quelques mois plus tard Cerva (34,36) est également le premier en Europe à isoler une souche de *Naegleria* à partir du LCR d'un malade.

D'autres cas sont encore signalés en Grande-Bretagne par Apley (8), ainsi qu'en Belgique où l'on dénombre maintenant cinq cas diagnostiqués par Jadin & Coll. (102,103,104), Hermanne & Coll. (96,97), Vandepitte & Coll. (236).

Un recensement récent a permis à Jadin (102) de dénombrer 84 cas de méningo-encéphalite amibienne primitive rapportés dans le monde et qui se répartissaient en 1974 de la manière suivante : 30 cas aux U.S.A., 17 en Tchécoslovaquie, 12 en Australie, 7 en Inde, 5 en Nouvelle-Zélande, 5 en Belgique, 4 en Angleterre, 1 en Irlande, 1 en Nouvelle-Guinée, 1 au Vénézuëla, 1 en Ouganda. Il faut ajouter à cette liste 1 cas en Zambie - Bhagwandeem & Coll. 1974 (15), ce qui porte le total à 85 cas publiés. Mais le nombre de souches isolées à partir de ces malades ne dépasse pas 26, ce qui montre que bien souvent le diagnostic n'a pu être établi que trop tard.

Le Syndrome de Méningo-encéphalite amibienne primitive.

Si dans un premier temps, à la suite des travaux de Culbertson (62,63), on a cru que les amibes en cause se rattachaient au genre *Acanthamoeba* (26,86), l'isolement de ces souches ensuite, à partir du LCR des malades, a montré que dans la grande majorité des cas l'agent responsable était *Naegleria*. C'est donc tout d'abord la pathologie des méningo-encéphalites amibiennes primitives provoquées par cette amibe que nous rappellerons ici.

A. Les Méningo-encéphalites primitives dues à *Naegleria fowleri*.

Le syndrome de méningo-encéphalite amibienne primitive, quoique bien individualisé, reste assez peu évocateur. L'évolution en est pratiquement toujours fatale.

Si l'on s'en tient aux cas attribués à *Naegleria*, ceux avec survie enregistrés ne dépassent pas deux : l'un rapporté par Apley en Grande-Bretagne (8) et l'autre par Anderson et Jamieson en Australie (5).

■ Epidémiologie.

La maladie survient généralement après une baignade facilement retrouvée dans l'anamnèse. Assez fréquemment on peut incriminer l'eau des piscines (cas belges et tchecoslovaques), ou même l'eau du réseau (5). Mais il s'agit souvent aussi, de baignades dans des eaux non surveillées : lacs de Floride (26), de Richmond (80) en Virginie ; canal (236) en Belgique. Parfois, on ne peut suspecter qu'un simple contact avec l'eau en dehors de tout exercice de natation : le cas rapporté par Apley (8) est celui d'un jeune enfant qui a pataugé dans un flaqué d'eau après un gros orage.

Quelquefois même, en raison de l'absence d'un contact particulier ou prolongé avec l'eau, on ne peut guère fournir d'explication satisfaisante. Ainsi, dans une région du sud de l'Australie, plusieurs malades dépistés par Carter (32) ont effectivement pris des bains, mais en piscines d'eau de mer. Or la croissance de *Naegleria fowleri* est inhibée dans un milieu dont la teneur en chlorure de sodium est égale ou supérieure à 0,5% (34). Un de ces malades même, - cas n°6 -, n'a eu aucun contact avec l'eau. En l'absence de toute autre explication, l'auteur a, pour ce sujet, attribué la contamination à la manipulation fréquente du fumier de cheval. Depuis, après la découverte de nouveaux cas, Miss Jamieson (117) incrimine l'eau du réseau à l'origine de la contamination, car elle arrive à isoler de cette eau plusieurs souches de *N. fowleri*.

■ Signes cliniques.

La durée d'incubation est variable mais reste comprise entre 2 et 8 jours pour la plupart des auteurs.

La première phase de la maladie est caractérisée par la triade pratiquement constante : céphalées qui vont s'exacerbant, vomissements et température élevée. Chez certains malades on note en outre des signes rhinopharyngés et des épistaxis. La durée de cette première période varie de quelques heures à 2 ou 3 jours au maximum.

L'état du patient s'aggrave ensuite rapidement en même temps qu'apparaît un syndrome méningé nécessitant une hospitalisation d'urgence. Le malade présente alors un tableau de méningite aiguë avec raideur de la nuque, signe de Kernig et de l'agitation. Il s'enfonce alors progressivement dans l'inconscience, un état de coma avec paralysie flasque s'installe

et, progressivement, l'EEG atteint un silence électrique total, la mort pouvant survenir à tout moment.

La durée totale de l'affection n'excède guère 4 à 6 jours dans la majorité des cas ; elle peut être prolongée par l'assistance respiratoire : le malade d'Apley (8) survécut ainsi jusqu'au 16^{ème} jour. Quelquefois, au contraire, elle évolue de manière foudroyante en 24 h. ou moins de 48 h.

■ Signes biologiques.

Devant ce tableau méningé, la ponction lombaire aussitôt pratiquée ramène un LCR trouble, évoquant une méningite aiguë purulente. La glycorachie est quelquefois légèrement diminuée. L'albuminorachie est, par contre, fortement augmentée : 400 - 500 mg à 1 g⁰ /₁₀₀ parfois. On note une hyperleucocytose variable, allant de quelques centaines d'éléments le plus souvent, à 10.000 leucocytes par mm³ et parfois 20.000 par mm³, composés de 80 à 95 % de polynucléaires neutrophiles. Un observateur peu averti risque d'ailleurs de confondre les amibes avec ces leucocytes.

Cependant l'attention doit être attirée par un fait surprenant : ce LCR, malgré son aspect purulent, ne parvient pas à faire ses preuves bactériologiques.

En réalité, un examen soigneux du LCR permet de repérer les amibes. Pour cela, il vaut mieux examiner un LCR conservé à la température ambiante, non centrifugé, et disposer d'un microscope à contraste de phase muni d'une platine chauffante. Les amibes se reconnaissent au milieu des polynucléaires grâce à leur forte réfringence et, surtout, grâce à l'émission de lobopodes très actifs chez *Naegleria*.

Cette recherche directe des amibes sur le LCR à l'état frais devrait toujours être pratiquée devant une méningite purulente "aseptique".

■ Traitement.

Le clinicien, face à ce tableau de méningite purulente aiguë, suspecte une étiologie bactérienne et administre un traitement antibiotique qui n'apporte aucune amélioration. Actuellement, nous ne disposons que d'une seule substance efficace : l'Amphotéricine B. Celle-ci est amoebicide *in vitro* et protège la Souris contre l'infection expérimentale (33,67,70,79).

Mais, jusqu'à présent, son application thérapeutique est restée décevante. Nous avons vu que deux guérisons seulement ont été enregistrées (5,8). Le plus souvent, donc, ce traitement reste inefficace, sans doute parce que mis en oeuvre trop tardivement (35,80,236). Cependant Duma (80) montre, chez deux malades traités mais décédés, que l'Amphotéricine B altère les amibes, fait qui corrobore les constatations expérimentales et doit nous confirmer dans l'absolue nécessité d'un traitement précoce et donc d'un diagnostic précoce.

Malgré la grande toxicité du produit, Carter (35) propose de l'employer en perfusion intraveineuse lente de 3 à 4 heures, en commençant par une dose de 0,25 mg / kg / jour, pour arriver rapidement à 1 mg / kg / jour. Ce mode d'administration permettrait d'atteindre des concentrations suffisantes dans le LCR. Toutefois, pour l'auteur, il serait préférable en cas d'urgence, d'utiliser une voie d'introduction plus directe et il propose l'injection intraventriculaire de 0,1 à 0,5 mg tous les 2 jours, avec surveillance attentive des signes de toxicité dus à l'irritation provoquée par le médicament.

Nous nous permettons quelques réserves sur l'utilisation de cette dernière voie. En effet nous pensons que son indication relève de l'urgence mais aussi, sinon surtout, de l'existence de blocage sur la circulation du LCR. Nous ne pensons pas que la toxicité du produit doive entrer en ligne de compte et croyons qu'en l'absence de dissociation albumino cytologique, la voie lombaire ou la voie sous-occipitale peuvent être aussi efficaces. Ce sont d'ailleurs celles utilisées dans le traitement des cryptococcoses méningées. Dans ce cas, les posologies de l'Amphotéricine B sont respectivement de 1 mg et de 0,5 mg.

On avait fondé de grands espoirs sur le Clotrimazole en raison de son activité amoebicide *in vitro*. Cependant Miss Jamieson (118) a récemment démontré que cette substance ne protégeait pas la Souris contre l'infection expérimentale.

B. Les Méningo-encéphalites primitives dues aux amibes *Acanthamoeba* et *Hartmannella*.

■ Bien que la majorité des souches isolées appartiennent au genre *Naegleria*, il serait inconsideré d'en conclure rapidement que le rôle pathogène des "amibes libres" chez l'homme est limité exclusivement à ce genre. Des publications récentes prouvent en effet que l'on observe chez l'homme certaines méningo-encéphalites amibiennes primitives indiscutablement provoquées par *Acanthamoeba*.

Il s'agit de cas rapportés par Patras et Andujar (163), par Callicott & Coll. (30), et plus récemment par Jager et Stamm (115), Robert et Rorke (185), Bhagwandeem & Coll. (15).

Différentes méthodes permettent d'affirmer qu'il s'agit bien d'*Acanthamoeba* ou d'*Hartmannella*, et donc d'exclure *Naegleria*. Une seule fois la souche responsable a pu être isolée à partir du LCR du malade par Callicott (30) : il s'agissait d'*Acanthamoeba astronyxis*.

Mais, le plus souvent, l'identification précise du genre en cause se fait à l'examen des coupes histologiques du cerveau sur lesquelles on met en évidence les kystes caractéristiques d'*Acanthamoeba* (15, 115, 185). La présence de kystes dans le cerveau semble être un signe pathognomonique des méningo-encéphalites amibiennes primitives à *Acanthamoeba* puisqu'on n'a jamais pu retrouver de kystes dans les cerveaux envahis par *Naegleria*.

Les trophozoïtes par contre, après fixation et coloration, présentent le même aspect : leur présence seule ne permet donc pas de différencier les genres sur les coupes histologiques à moins de recourir aux techniques d'immunofluorescence indirecte.

Parfois on peut observer une amibe fixée en cours de division dont le mode mitotique permet d'exclure formellement *Naegleria* (15).

■ Les méningo-encéphalites primitives dues à *Acanthamoeba* se distinguent nettement de celles dues à *Naegleria* par plusieurs particularités.

■ L'origine de la contamination est ici très difficile à établir : seul le malade de Robert et Rorke (185) a eu un contact prolongé avec l'eau au cours d'une inondation de sa cave. Par contre, dans les méningo-encéphalites primitives à *Naegleria*, la contamination est souvent consécutive à un

exercice de natation.

■ L'évolution clinique générale est plus lente, voire même chronique, ce qui oppose ces méningites aux méningo-encéphalites aiguës foudroyantes provoquées par *Naegleria*, la durée de l'évolution étant en principe supérieure à 15 jours et pouvant atteindre 4 à 5 semaines (115,185).

■ Enfin, l'infection à *Acanthamoeba* se voit plutôt chez des sujets âgés ou débilités : le patient de Patras et Andujar (163), celui de Robert et Rorke (185) sont des alcooliques notoires, tandis que celui de Jager et Stamm (115) est atteint d'une maladie de Hodgkin et reçoit des immunosuppresseurs depuis onze ans.

■ Mis à part le cas de guérison signalé par Callicott & Coll.(30) concernant un sujet jeune et auparavant en bonne santé, l'issue est fatale, sans doute favorisée par un état de défense amoindrie.

Autres Rôles pathogènes des Amibes libres chez l'Homme et chez l'Animal.

■ La littérature abonde en publications, anciennes ou récentes, qui rapportent la présence d'amibes libres les plus diverses chez toutes sortes d'animaux. Il semble que, dans bon nombre de cas, celle-ci s'accompagne de l'apparition d'un rôle pathogène. Ce parasitisme facultatif se retrouve à différents échelons du règne animal. Page, en 1974 (157), dresse un inventaire de toutes ces observations et propose le terme d'"amphizoïque" pour les espèces capables de mener une vie libre et susceptibles de s'adapter à la vie parasitaire.

■ Mollusques :

Richards (184) signale l'infection de Gastéropodes par deux nouvelles espèces de *Hartmannella*, tandis qu'en Polynésie, *Hartmannella tahitiensis* serait à l'origine d'une sévère épidémie chez les huîtres (58).

■ Crustacés :

Sprague & Coll. (229,230,231) ont décrit une amibe du genre *Paramoeba* associée à une maladie du crabe *Callinectes sapidus*.

■ Amphibiens - Reptiles :

Frank et Bosch (87) ont isolé des souches d'amibes libres (*Acanthamoeba*, *Hartmannella* et *Vahlkampfia*) à partir de cerveaux de grenouilles, de ser-

pents et de lézards.

■ Poissons :

Sawyer & Coll. (194) rapportent l'infection de Truites et de Saumons par *Thecamoeba*, amibe localisée au niveau de l'ouïe et des branchies et entraînant la mort des poissons.

■ Mammifères :

Des atteintes pulmonaires par *Acanthamoeba* ont été signalées chez différents Bovidés par Dwivedi et Singh (83), par Mac Connell & Coll. (120). Enfin, *Acanthamoeba* a été retrouvée chez un chien atteint de multiples lésions hémorragiques (11).

■ Un nombre encore plus important d'observations rapportent la présence d'amibes libres dans le tube digestif, mais sans mention d'un véritable rôle pathogène. Cette localisation entérique a été remarquée à maintes reprises. Jadin & Coll. (108) ont bien démontré qu'elle n'a rien d'exceptionnel puisqu'ils retrouvent 17 fois des amibes libres dans le contenu intestinal de 27 animaux les plus divers - Amphibiens, reptiles, poissons, oiseaux, singes -, mais aussi chez l'homme : 10 selles sur 348 échantillons ont permis d'isoler des amibes libres.

■ Les travaux de Jadin nous ramènent à l'homme et confirment des publications beaucoup plus anciennes qui restèrent sans grand retentissement à leur époque malgré leur contenu aujourd'hui prémonitoire. Ainsi, la première description de *Naegleria gruberi* fut faite en 1899 par Schardinger (199) qui l'avait isolée non de l'eau, mais de selles diarrhéïques humaines. Dans les années qui suivent, différents auteurs, Lesage (127) et Noc (141) en Indochine, Musgrave et Clegg (136), Walker (243) aux Philippines, ont l'occasion d'isoler des amibes "*Limax*" à partir des selles, ou d'abcès du foie. Chatton et Lalung-Bonnaire (56) découvrent dans les selles d'un sujet diarrhéïque une amibe très différente de *Entamoeba histolytica*, qu'ils étudient et entretiennent en culture. A cette occasion, ils créent le nouveau genre *Vahlkampfia*. Cependant, à la suite des travaux de Schaudinn (200), on admet que seule *E. Histolytica* représente l'amibe pathogène chez l'homme.

■ Mais le pouvoir pathogène de ces amibes est peut-être plus étendu qu'on ne le soupçonnait ? Dès 1967, Armstrong et Pereira (9), en

Grande-Bretagne, s'aperçoivent que le "Ryan virus" isolé par Pereira & Coll. (167) du nasopharynx d'enfants atteints de fièvre et de troubles respiratoires, est en réalité *Acanthamoeba castellanii*. La souche est étudiée par Warhurst et Armstrong (244) qui confirment cette identification.

■ Simultanément, aux Etats-Unis, grâce à une enquête touchant 2.289 personnes, Wang et Feldman (243) découvrent 38 sujets porteurs d'amibes au niveau du pharynx. Parmi ceux-ci on remarque surtout des enfants de moins de 5 ans. Cerva & Coll. (50), ayant recours à l'écouvillonnage nasal, mènent une enquête épidémiologique semblable et isolent des amibes chez 7 % des 1.551 soldats examinés. La mise en culture des prélèvements dans ces deux enquêtes, aboutit à l'identification d'amibes appartenant surtout au genre *Acanthamoeba*.

Si intéressantes que soient ces publications, nous faisons quelques réserves quant à leurs résultats. En effet : les auteurs américains, tout comme les auteurs tchèques, ne spécifient pas sous quelles formes végétatives, ou kystiques, étaient les amibes qu'ils ont isolées. On sait que le nez se comporte comme un filtre à l'égard de l'air inspiré et qu'il est donc capable de retenir des kystes en suspension dans l'air. Les amibes isolées en culture sont-elles alors vraiment des amibes du pharynx ?

■ Skocil & Coll. (Réf. 222 à 227) remarquent qu'il existe une corrélation entre la présence d'amibes au niveau du rhinopharynx et certains troubles accusés par les sujets, tels que rhinites, céphalées, épistaxis.

■ Jakovljevic et Talis (116) isolent *Hartmannella* à partir d'une oreille infectée, tandis que Jones (119) et Nagington (137) montrent le rôle d'*Acanthamoeba polyphaga* à l'origine d'ulcérations de la cornée : trois observations avec perte d'un oeil malgré le traitement.

■ Au total, le rôle pathogène des amibes libres semble largement déborder le cadre de la méningo-encéphalite primitive, et même le domaine médical. Cependant, dans ce domaine, il a fallu attendre plus de 60 ans pour s'apercevoir que les limites existant entre amibes pathogènes, amibes saprophytes et amibes libres, sont singulièrement mouvantes, ce qui permettra à Garnham de dire, en 1972 : "— L'abîme qui sépare les amibes libres des amibes pathogènes est comblé."

Prophylaxie.

Jadin s'est attaché à démontrer la présence fréquente et quasi ubiquitaire des amibes libres dans notre environnement quotidien et pas seulement dans les piscines(105,106,110,111). Ainsi : l'analyse de l'eau du réseau dans 36 villes d'Europe, d'Afrique, d'Asie, et des U.S.A., permet de trouver 26 fois des amibes. Même les eaux minérales ne sont pas exemptes de cette pollution : sur 20 échantillons étudiés, 8 renfermaient des amibes. Nous avons nous-même, obtenu des résultats analogues pour les eaux minérales : sur 5 marques différentes d'eau plate analysées à deux reprises - soit dix échantillons -, 4 marques renfermaient des amibes, une seule était indemne. Les eaux gazeuses paraissent moins favorables à la survie de ces amibes, puisque sur 5 marques examinées également à deux reprises, nous n'avons trouvé qu'un seul échantillon positif (1 / 10).

La présence d'amibes "Limax" dans la poussière, ou en suspension dans l'air, a été démontrée par Kingston et Warhurst (122), et par Skocil, Cerva et Serbus (225).

Enfin, certains auteurs ont pu isoler directement du milieu extérieur, des souches hautement pathogènes. Anderson et Jamieson (6) ont ainsi réussi à cultiver dix souches pathogènes de *Naegleria fowleri* isolées à partir de l'eau du réseau en Australie du sud, et même une souche isolée à partir du sol. Par cinq fois, Singh et Das (218) ont retrouvé dans des boues d'égoût, des *Naegleria* pathogènes et *Acanthamoeba culbertsoni* ; cette fréquence apparaît d'ailleurs bien élevée puisqu'en fait, l'isolement de *Naegleria* pathogènes à partir du milieu extérieur constitue une exception et reste très difficile à réaliser : la plupart des auteurs, non des moindres, ont jusqu'à présent échoué - Cerva, Butt, Culbertson, Jadin, etc.

Ces données nous prouvent qu'il existe donc réellement un danger potentiel pour l'homme, en raison de la présence quasi universelle des amibes libres dont certaines peuvent éventuellement être pathogènes.

Nous avons vu par ailleurs, qu'il n'existe pratiquement pas de traitement ou qu'en tout cas il est difficile de l'instaurer suffisamment tôt pour qu'il soit efficace. Dans ces conditions, on comprend l'importance considérable des mesures prophylactiques. Nous rappellerons ces mesures en ce qui concerne le cas particulier des piscines, et nous envisagerons

ensuite l'attitude générale préconisée par Jadin face à ce problème dans son ensemble.

A. Prophylaxie dans les Piscines.

Les travaux de Derreumaux (73) montrent qu'un minimum de 0,5 mg / l de "chlore actif", correspondant à l'acide hypochloreux sous sa forme libre, est suffisant pour entraîner l'éradication des amibes. Mais, pour garantir ce minimum, il faut maintenir en permanence un taux de "chlore libre" correspondant à l'ensemble des deux formes en équilibre Hypochlorites $\rightleftharpoons$ acide hypochloreux, d'au moins 1 mg / l. Le pH de l'eau, d'autre part, doit se situer autour de 7,4 et ne jamais dépasser 7,6. Le taux de matières organiques doit être aussi réduit que possible car il conduit à la formation de chloramines, inefficaces et irritantes.

D'autre part, Cerva (48) a démontré que les filtres à sable constituent, en fait, le milieu idéal pour le développement des protozoaires et jouent le rôle de "réservoir à amibes". Il préconise de traiter ces filtres quotidiennement avec de l'eau chaude à 70°C.

Il faut proscrire également l'emploi de tout matériau poreux tel que le bois, ou le liège, dans les installations du bassin ou ses abords immédiats.

Conformément à la législation actuellement en vigueur, on procédera chaque jour à un nettoyage soigneux du fond du bassin à l'aspirateur, afin d'éliminer tout dépôt éventuel. De même, chaque jour, l'eau doit être renouvelée à raison d'un dixième du volume total du bassin. Enfin, tous les trois mois, on effectuera la vidange complète du bassin suivie d'un brossage énergétique de ses parois avec un désinfectant, avant sa remise en eau.

B. Prophylaxie générale.

Sur un plan plus général, Jadin (106) s'est fait l'ardent défenseur du contrôle biologique des eaux. Selon lui, le contrôle bactériologique traditionnel ne reflète qu'imparfaitement le degré de pollution réel d'une eau, car les protozoaires, et notamment les amibes, renferment dans leurs vacuoles digestives de nombreux micro-organismes qui sont en quelque

sorte masqués au bactériologiste. En dehors du pouvoir pathogène intrinsèque particulier à certaines d'entre elles, les amibes peuvent servir de véhicules à des germes redoutables pour notre santé ainsi que Jadin (113) l'a démontré pour les mycobactéries, et notamment pour *Mycobacterium leprae*. Schuster et Dunnebacke (82,202,203,204) ont retrouvé des particules virales à l'intérieur du noyau et du cytoplasme de certaines souches de *Naegleria*, mais leur présence paraît sans relation avec l'existence d'un pouvoir pathogène chez l'amibe.

Il devient donc désormais difficile à l'hygiéniste de négliger la présence, dans les eaux, d'amibes libres, que celles-ci soient pathogènes par elles-mêmes, ou qu'elles jouent simplement le rôle d'agents vecteurs de germes ou de virus. Le contrôle biologique de l'eau apparaît donc indispensable.

Au terme de cette étude, nous voulons insister sur la gravité des méningo-encéphalites amibiennes, qu'elles soient provoquées par *Naegleria fowleri* ou par les amibes du genre *Acanthamoeba*. La multiplication des observations publiées depuis 1965 met en exergue la nécessité d'une prophylaxie. Mais, pour être efficace, celle-ci doit s'appuyer sur des connaissances sûres et nous verrons, dans le chapitre suivant, qu'il n'existe pas terrain plus mouvant que celui des amibes libres.

Généralités sur les Amibes libres

Dans ce chapitre consacré à une revue de la littérature concernant les amibes libres, nous verrons les méthodes de culture utilisables pour l'isolement et l'entretien des souches ; les moyens d'étude permettant de définir leurs caractères morphologiques, cytologiques, biochimiques et immunologiques. ; les renseignements apportés par la microscopie en contraste de phase, - mode d'étude que nous avons utilisé - ; enfin, nous terminerons par un essai de systématique amibienne.

Méthodes de Culture des Amibes libres

Les amibes libres, du moins les petites formes, sont essentiellement bactériophages. C'est pourquoi les cultures pour l'isolement et l'entretien des souches se font généralement en présence de bactéries.

Toutefois, pour l'étude du pouvoir pathogène, comme pour celle des caractères biochimiques et immunologiques de ces amibes, il est nécessaire de tenter d'axéniser les cultures. Nous verrons donc ces deux techniques.

A. Culture avec Aliment bactérien figuré.

Le principe essentiel de ce type de culture est d'éviter une prolifération excessive des bactéries susceptibles d'inhiber le développement des amibes elles-mêmes.

Le maintien d'un juste équilibre entre l'aliment bactérien et les amibes prédatrices nécessite de recourir à des supports pauvres et non nutritifs, destinés à freiner la croissance bactérienne. Ces supports ont également l'avantage de diminuer le risque de contamination et d'envahissement par les moisissures.

■ La méthode que Singh (208) a largement diffusée s'inspire elle-même des procédés utilisés par certains auteurs du début de ce siècle, Mouton, Musgrave et Clegg, pour l'isolement à partir des selles, de ce que Chatton a appelé les "amibes libres de culture". Singh (208) préconise

l'emploi d'une gélose non nutritive à 15 ‰ sur laquelle on étale les bactéries. Le choix de ces bactéries n'est sûrement pas indifférent. Singh lui-même (209,210,211), s'est attaché à démontrer l'existence d'une "sélectivité" bactérienne chez les amibes. En réalité, les conditions expérimentales utilisées par Singh traduisent plus l'aptitude et la rapidité d'assimilation d'une souche d'amibes par rapport à différentes bactéries données séparément, qu'un choix véritable de la part des amibes.

■ Depuis les travaux de Singh on utilise comme aliment bactérien des Entérobactéries, - Escherichia, Aerobacter, Klebsiella - , qui seraient les germes convenant le mieux à la croissance des amibes.

■ Mais Singh n'a travaillé, dans ce domaine, qu'avec un nombre limité de souches d'amibes et il est bien évident que des résultats obtenus pour un genre déterminé, ne sont pas forcément extrapolables pour d'autres. Ces préférences nutritionnelles des amibes mériteraient donc de nouvelles études approfondies. Cette méthode classique utilisant pour milieu une gélose pauvre et pour aliment bactérien, le plus souvent Aerobacter aerogenes, apparaît parfois insuffisante. Ainsi : avec certaines souches qui s'enkystaient régulièrement au cours des premiers repiquages, on constate parfois une diminution très nette du pouvoir d'enkystement avec absence complète de kystes, ou encore formation de kystes non viables qui dégénèrent. Ce phénomène peut toucher l'ensemble ou une partie seulement de la population ; il peut aussi être soit passager - en quelque sorte accidentel - ; soit au contraire, définitif, s'accroissant avec le temps. Cette anomalie, sûrement due à des conditions de culture défectueuses, a été signalée par de nombreux auteurs (142,143,176,214). Nous l'avons nous-même constatée avec plusieurs de nos souches. Par ailleurs, beaucoup de souches, sur ce milieu de culture, ne produisent jamais de kystes et se maintiennent perpétuellement depuis leur isolement, à l'état de formes végétatives. On n'a jamais pu déterminer si cette absence d'enkystement provient des conditions de culture, ou si elle constitue un caractère propre à ces souches. Enfin, nous formulerons une dernière critique à cette méthode qui définit plus ou moins arbitrairement des conditions de culture : nous ne sommes pas assurés que l'utilisation d'Aerobacter aerogenes comme unique aliment bactérien permette le développement de toutes les amibes bactériophages. Peut-être exerçons-nous, sans le savoir, une certaine sélection des amibes. C'est pourquoi nous n'avons pas systématiquement éliminé la

flore associée, ni recouru aux antibiotiques.

■ Néanmoins, malgré ces inconvénients, la méthode de Singh est universellement utilisée en raison de sa grande simplicité. En cas de croissance ou d'enkystements difficiles, Pussard (179) recommande cependant l'addition à la gélose, d'extrait de malt (1⁰/°°) ou d'une solution de Winogradsky contenant plusieurs oligo-éléments (Cf. Annexe I.).

B. Culture axénique.

Il semble qu'actuellement on ne puisse cultiver qu'un nombre très réduit d'amibes, qui se limitent d'une façon générale au genre *Acanthamoeba* et aux seules *Naegleriae* pathogènes, c'est-à-dire *Naegleria fowleri*.

Deux raisons essentielles, conjuguant d'ailleurs leur effet, sont sans doute à l'origine de cette absence de résultats : d'une part les milieux liquides actuellement utilisés ne semblent pas permettre l'axénisation de toutes les variétés d'amibes rencontrées ; d'autre part, personne n'a procédé à de véritables essais d'axénisation en testant systématiquement toutes les souches isolées sur les milieux actuels, ce qui aurait peut-être permis d'augmenter les résultats positifs.

■ Culture axénique d'*Acanthamoeba*.

Ces amibes sont relativement faciles à cultiver et elles ont pu être axénisées avec succès sur différents milieux (1,14,28,138). Il s'agit de milieux synthétiques, de composition entièrement définie comprenant en général des sels minéraux, des sucres comme source de carbone, ainsi que de la peptone comme source d'acides aminés.

■ Culture axénique de *Naegleria*.

La culture de ces amibes est plus difficile. Jusqu'à présent, elle n'a été réalisée que sur des milieux synthétiques semi-définis, c'est-à-dire en présence de sérum. Cerva (45), le premier, réussit la culture axénique de *Naegleria* en l'absence de tout aliment bactérien figuré, sur un milieu (Cf. Annexe I.) dont la formule a ensuite été modifiée par Willaert (245). Cet auteur ajoute du glucose et différentes vitamines améliorant la

richesse des cultures : le milieu de Cerva modifié devient le milieu CGVS (Cerva - Glucose - Vitamines - Sérum)(Cf. Annexe I.).

D'autres formules de milieux comparables ont été proposées pour la culture axénique de *Naegleria* (Fulton (88) ; Nelson (139)(Cf. Annexe I.).

Suivant les lots de sérum utilisés, l'axénisation s'avère plus ou moins bonne, voire même impossible. C'est pourquoi tous les auteurs préconisent maintenant l'emploi du sérum foetal de veau, qui améliore de façon appréciable le rendement et la constance des cultures.

Mais, en réalité, tous ces milieux ne permettent d'axéniser que *Naegleria fowleri* qui est isolée, la plupart du temps, du LCR des malades ou, beaucoup plus rarement, du milieu extérieur.

Les souches *Naegleria* d'origine libre qui, dans leur immense majorité, appartiennent à l'espèce non pathogène *Naegleria gruberi*, ne peuvent s'axéniser sur ces milieux (5,245).

Toutefois, ce principe général souffre quelques exceptions faisant soupçonner la grande complexité et la variabilité de ces protozoaires. Ainsi, Willaert et Le Ray (247) ont isolé d'une piscine une souche de *Naegleria* non pathogène qui, cependant, se cultive axéniquement à 28°C, mais non à 37°C. Par ce caractère biologique ainsi que par ses propriétés immunologiques, cette amibe se différencie à la fois de *N. Gruberi* et de *N. fowleri*. Ces auteurs décident donc d'en faire une nouvelle espèce, en quelque sorte intermédiaire, qu'ils nomment *Naegleria jadini*.

Parmi les souches de *Naegleria* d'origine libre recueillies par Anderson et Miss Jamieson (In : 248), la souche PP 397, bien que pathogène pour la Souris et morphologiquement identique à *N. fowleri*, n'a pas encore pu être cultivée axéniquement.

■ Pour nous résumer, deux méthodes de culture sont applicables aux amibes libres. La première, qui recourt à une gélose pauvreensemencée d'un aliment bactérien, *Aerobacter aerogenes*, sert essentiellement à isoler et à entretenir les souches d'amibes. Elle est, nous l'avons vu, parfois insuffisante, mais sa simplicité explique sa large utilisation. La seconde méthode vise à obtenir des souches pures d'amibes n'ayant plus besoin d'aliment bactérien. Il est évident que l'axénisation, quand elle est possible, ouvre la voie à l'étude des caractères biochimiques et immunologiques des amibes.

Modes d'étude des Amibes libres

A. Etude des Caractères morphologiques et cytologiques.

On pourrait s'étonner qu'un moyen d'approche aussi rudimentaire, pour ne pas dire dépassé aux yeux de certains, trouve encore droit de cité dans l'étude des rhizopodes. Mais le retard ainsi que l'état de confusion qui s'attachent aux connaissances actuelles sur les amoebiens nus, expliquent que l'étude des caractères morphologiques joue encore un rôle primordial, pour ne pas dire essentiel.

En 1900, Dangeard reconnaissait déjà : "— Rien n'est plus difficile que de déterminer une amibe."

Cette difficulté est inhérente à la nature même des amibes qui, selon l'étymologie de leur nom commun, sont dépourvues de forme particulière puisqu'elles en changent constamment. Cette plasticité extraordinaire, leur pauvreté en éléments favorables à l'établissement d'une classification, sont sans doute à l'origine de cet état de carence.

Hormis le fait que beaucoup d'espèces et de genres restent sans doute à découvrir, il faut souligner que de nombreuses espèces, décrites à la fin du XIX^{ème} et au début du XX^{ème} siècles, n'ont été vues qu'une seule fois puisque non cultivées et que la majorité des anciennes descriptions étaient accompagnées d'une illustration fort réduite, pour ne pas dire médiocre. On comprend, dès lors, que nous sommes loin d'avoir épuisé toutes les ressources de l'étude morphologique, aujourd'hui enrichie des documents photographiques devenus indispensables.

Il est certain que ce moyen d'investigation présente des limites qui sont celles de toute observation microscopique traditionnelle, et qu'il ne permet pas toujours de trancher avec certitude. Le recours à des méthodes plus spécialisées, telles que microscopie électronique, étude des caractères biochimiques et immunologiques, doit alors venir renforcer l'examen microscopique. Ces méthodes plus fines rendent de grands services au niveau des échelons taxonomiques inférieurs comme le genre, et surtout l'espèce, ainsi qu'en témoignent les travaux de Willaert sur *Naegleria* (246). Elles ne peuvent cependant pas précéder l'étude morphologique.

Non seulement celle-ci ne doit pas être reléguée au second plan mais, en l'état actuel de la classification, elle conserve un rôle priori-

taire. Il apparaît logique de s'adresser à elle dans un premier temps : par rapport aux méthodes plus élaborées, elle a l'avantage d'offrir rapidement une sorte de vue d'ensemble de la cellule, ce qui s'avère indispensable pour démêler la situation au niveau des taxa les plus élevés et même, quelquefois, au niveau des genres et des espèces.

L'étude morphologique des amibes libres peut se faire soit sur préparations fixées et colorées, soit sur le vivant ; mais, quelle que soit la méthode retenue, il faut disposer, pour réaliser l'examen dans de bonnes conditions, d'un nombre important d'amibes normales. Ces deux exigences imposent donc avant toute étude, l'obtention préalable de cultures florissantes.

■ Examen vital.

Il faut, bien entendu, proscrire le simple examen entre lame et lamelle.

En effet, celui-ci n'assure pas la survie des amibes au-delà de quelques minutes en raison du dessèchement progressif de la préparation, et risque donc de favoriser l'apparition d'artéfacts précédant la mort des cellules.

Cette restriction faite, deux méthodes sont actuellement utilisées pour ce type d'examen.

■ La méthode "en goutte pendante".

C'est, semble-t-il, la méthode préférée des auteurs anglo-américains (142,193,196).

Elle consiste à examiner une goutte de préparation renfermant les amibes et bactéries qui se trouve suspendue à une lamelle, elle-même placée soit au-dessus d'une lame porte-objet munie d'une concavité, soit au-dessus d'une cellule que l'on réalise en collant un anneau sur une lame de verre. La chambre humide que l'on obtient doit être rendue soigneusement étanche : elle sera lutée de façon hermétique avec de la vaseline.

La goutte pendante a deux inconvénients majeurs : l'observation à un fort grossissement est troublée par les phénomènes de réflexion et de réfraction qui se produisent inévitablement à la surface d'une goutte sphérique ; mais, surtout, les amibes ne sont pas placées dans des conditions d'étalement suffisantes, et indispensables, à leur examen

cytologique : surmontées par une couche liquidienne importante, elles conservent, au contraire, une allure ramassée et une épaisseur peu favorables à l'observation de certains détails. Ce procédé permet cependant d'apprécier la silhouette des amibes en déplacement dans un film liquidien important, ou encore celle des formes flottantes.

La morphologie des amibes placées dans ces conditions particulières se révèle souvent différente de celle d'une amibe étalée en rep-
tation sur le substrat.

■ La Culture sur Lames.

Cette méthode d'examen sur le vivant a été mise au point par Pussard qui s'est inspiré du protocole recommandé par Singh (212) pour l'obtention de lames riches en amibes. Il s'agit de véritables microcultures d'amibes sur milieu gélosé, dont la réalisation a été publiée à plusieurs reprises (1973 (179) ; 1974 (180) par son auteur. Nous en verrons la description ultérieurement (Cf. Chapitre III) car nous avons, en fait, effectué toutes nos observations grâce à ce procédé.

Mais nous voudrions insister, dès maintenant, sur les nombreux avantages que présente cette technique d'examen encore peu utilisée dans le domaine de la recherche sur les amibes. Les cultures sur lames, à la différence de la goutte pendante, placent les amibes dans des conditions d'étalement optimum, exigence essentielle d'une bonne étude cytologique en contraste de phase. L'examen sur le vivant permet en outre, d'éviter les artéfacts secondaires à la fixation tout en assurant des possibilités d'observation a priori satisfaisantes puisque compatibles avec la survie et la multiplication des amibes.

Un des avantages essentiels de cette méthode est de pouvoir suivre la dynamique et le déroulement des principaux phénomènes marquant le cycle cellulaire d'une amibe. La préparation histologique classique ne fournit qu'une vision instantanée de la cellule, elle équivaut à un enseignement beaucoup plus limité.

Les lames de microcultures se conservent tout le temps nécessaire et il devient possible d'examiner, sur une seule lame, une succession d'évènements tels que le dékystement, les modes de déplacement et d'alimentation, la nature des pseudopodes, l'allure générale de l'amibe,

et son enkystement éventuel quand l'aliment bactérien aura été épuisé. Enfin, le déroulement chronologique de la mitose sera suivi dans sa totalité, alors que l'examen cytologique après fixation ne fournit, dans le meilleur cas, que des stades mitotiques isolés et dispersés dont il faut reconstituer l'enchaînement, tel un puzzle, par une recherche longue et minutieuse.

■ Examen après Fixation.

Une observation attentive réalisée sur le vivant apporte dans bien des cas, des renseignements aussi nombreux et précieux que la meilleure des préparations cytologiques. Néanmoins l'examen en contraste de phase ne permet pas toujours de résoudre les difficultés d'analyse et d'identification rencontrées parfois dans l'étude de certaines souches. Dans ce cas, la mise en route de colorations cytochimiques devrait parvenir à lever les ambiguïtés.

La réalisation de toute technique cytologique sur les amibes libres passe par les étapes suivantes.

■ L'obtention de lames riches en amibes.

■ Cette nécessité a été résolue par Singh en 1950 (212) lorsqu'il a, le premier, proposé la méthode ci-après, largement utilisée par la suite (71,214,216).

La souche à étudier est repiquée à plusieurs reprises, toutes les 24 ou 48 heures, sur agar non nutritif à 1,5% recouvert d'*Aerobacter aerogenes* afin d'exacerber le rythme des divisions.

Un mince film d'agar est alors réalisé sur une lame porte-objets en laissant tomber 2 ou 3 gouttes de gélose liquéfiée au bain-marie, qui sont aussitôt recouvertes avec une lamelle couvre-objet. Lorsque la gélose a pris en masse, la lamelle est décollée délicatement à l'aide de pinces fines et les bords du carré de gélose ainsi obtenu sont égalisés au scalpel.

A l'aide d'une pèse, on dépose délicatement à la surface de ce film d'agar, un enduit d'*Aerobacter aerogenes*.

Les amibes de la dernière subculture sont ensuiteensemencées en masse sur le film d'agar recouvert de bactéries. Les lames ainsi préparées sont incubées dans des boîtes de Pétri garnies de papier filtre

pour éviter la dessiccation.

Après 24 à 48 heures d'incubation le film est en principe recouvert d'amibes en phase active de multiplication que l'on fixe en plongeant la lame dans le fixateur choisi.

Après le temps de fixation, les lames sont passées dans l'alcool à 90° pendant 24 h. puis, successivement, dans l'éthanol à 70°, 50°, 30°, et enfin, dans l'eau distillée. Le film d'agar est enlevé des préparations en agitant doucement la lame dans l'eau distillée : en principe un grand nombre de trophozoïtes restent collés à la lame après le décollement de la gélosé.

■ Pussard (179,180) utilise une variante personnelle de cette méthode. L'auteur découpe en menus fragments le film de gélose obtenu comme précédemment, ces fragments sont écartés très légèrement les uns des autres de façon à ce qu'un film liquidien très mince puisse persister entre les différents morceaux durant l'incubation. Après ce découpage, onensemence la préparation avec un mélange de bactéries et d'amibes et on incube les lames en atmosphère humide.

Lorsque le développement est jugé suffisant, les lames sont fixées.

Au cours du lavage ultérieur, les fragments de gélose ainsi que les bactéries sont éliminés, tandis que les amibes restent fixées à la lame par leur glycocalyx.

■ La Fixation.

Le choix du fixateur est de la plus grande importance pour la qualité du résultat final. Le fixateur idéal doit à la fois conserver l'attitude naturelle des amibes en mouvement et respecter les structures nucléaires et cytoplasmiques.

Pour satisfaire à ces exigences, Pussard (179,180) préconise l'emploi de fixateurs à base d'acide osmique, qui donnent de meilleurs résultats : fixateurs de Flemming, d'Hermann, de Lindsay-Johnson, de Champy. Cet auteur déconseille fortement l'utilisation de mélanges fixateurs riches en acide acétique tel que le Carnoy pourtant largement employé. Le Nissenbaum utilisé par Page , serait le moins mauvais de ce type de fixateurs.

■ Colorations.

Seules les réactions cytochimiques peuvent présenter un réel intérêt par rapport à l'examen en contraste de phase. Les colorations utilisées sont assez peu nombreuses et la qualité des résultats obtenus souvent décevante quant aux efforts fournis.

Parmi celles les plus employées, et les plus utiles, on peut citer rapidement :

- la coloration au PAS ou par les solutions de bleu Alcian, pour la recherche des polysaccharides au niveau du glycocalyx ;
- le réactif au chloro-iodure de zinc, pour la détection de la cellulose au niveau des kystes ; le noir Soucian pour les lipides.
- La réaction de Feulgen rend de précieux services dans l'étude de la mitose. Elle doit être employée surtout lorsque l'étude de la division sur le vivant au microscope en contraste de phase s'avère difficile, ou encore, lorsqu'il s'agit de confirmer la nature chromatinienne ou nucléolaire de formations inhabituelles apparaissant au cours de certaines mitoses.

En résumé, l'étude des caractères morphologiques et cytologiques peut se faire soit sur des amibes vivantes observées "dans une goutte pendante" ou sur une culture sur lame, soit sur des amibes mortes fixées - par l'acide osmique de préférence -, et colorées.

Les deux méthodes imposent au préalable, l'obtention de lames riches en amibes.

B. Etudes des Caractères biochimiques et immunologiques.

Ces études ont permis de fournir des résultats très intéressants dont nous donnerons quelques exemples. Mais leur extension à l'ensemble des amibes libres est malheureusement entravée par l'impossibilité actuelle d'obtenir des cultures axéniques.

C'est pourquoi l'essentiel des travaux effectués dans ces deux domaines concerne principalement *Acanthamoeba* et *Naegleria*.

■ Etude des Caractéristiques biochimiques et biologiques.

■ Les recherches de biochimie fondamentale ont porté surtout sur les *Acanthamoeba*, mais elles ont été entreprises de façon très dispersée et les résultats obtenus sont donc d'un intérêt limité pour résoudre les difficultés actuelles de la systématique amibienne.

Ces travaux ont porté indistinctement, tour à tour, sur :

■ Les exigences nutritionnelles d'*Acanthamoeba* (1), en particulier au niveau des sucres (3,14) ; l'étude de l'ADN (4) ; l'étude de l'équipement enzymatique, qui montre l'existence d'hydrolases lysosomiales (135), et d'une phospholipase (85) dont l'activité particulièrement importante chez *Acanthamoeba culbertsoni* explique peut-être son pouvoir pathogène (240).

■ Le déterminisme de l'enkystement, étudié par Griffiths et Hughes (94,95) qui ont montré, en particulier, le rôle indispensable joué par le magnésium. Le passage à l'état kystique s'accompagne en outre de modifications importantes de l'équipement enzymatique (182).

■ Enfin, les conditions du dékystement et son déclenchement ont été étudiés par Singh & Coll. (215,217) et Rastogi & Coll. (183) qui constatent au cours de cette étape, un remaniement enzymatique important avec reprise d'activité de certains enzymes alors que d'autres sont réprimés.

■ La comparaison des caractères biologiques permet d'établir quelquefois des constatations intéressantes.

Griffin (93) a découvert que la possibilité de cultiver certaines souches de *Naegleria* et d'*Acanthamoeba* à des températures élevées est liée à l'existence d'un pouvoir pathogène chez ces amibes : *Naegleria fowleri* $\ll 45^{\circ}\text{C}$; *Acanthamoeba culbertsoni* $\ll 41^{\circ}\text{C}$; alors que les espèces non virulentes ne supportent que des températures inférieures à 37°C .

■ Etude des Caractères immunologiques.

De nombreux travaux ont été menés pour l'étude immunologique d'*Acanthamoeba* et de *Naegleria*, sans doute en raison des applications médicales qu'on en escomptait.

Si la contribution des méthodes sérologiques au diagnostic médical est restée jusqu'à présent limitée et décevante, en revanche, leur uti-

lisation s'est avérée fructueuse dans l'identification et la différenciation des espèces appartenant à ces deux genres.

Les premiers résultats obtenus ont, en effet, permis de constater une absence presque totale de parenté antigénique, non seulement entre des genres de familles différentes, mais même entre différents genres d'une même famille. Cette disparité antigénique montre bien que les Rhizopodes, sous une simplicité apparente des structures, masquent en réalité une complexité évolutive encore insoupçonnée. Par ailleurs, la recherche des caractères immunologiques a fait découvrir l'existence de plusieurs espèces au sein du genre *Naegleria* et établir définitivement l'individualité d'une espèce pathogène parmi elles.

■ Utilisation des Méthodes sérologiques à des Fins diagnostiques.

■ Il semble qu'en raison de l'évolution foudroyante des méningo-encéphalites primitives à *Naegleria*, les anticorps n'aient pas le temps d'apparaître, à moins que leur absence ne s'explique par le manque d'antigènes circulants. De toute façon, d'un point de vue pratique, leur détection risquerait d'apporter une réponse trop tardive pour intervenir efficacement sur le plan thérapeutique.

■ Par contre, en ce qui concerne les affections chroniques à *Acanthamoeba*, des anticorps ont pu être décelés à plusieurs reprises. Ainsi, expérimentalement, Culbertson & Coll. (63) suivent l'apparition d'anticorps fixant le Complément chez des lapins et des singes, après inoculation intraveineuse d'*Acanthamoeba culbertsoni*. Après l'identification par Armstrong et Pereira (9) du "Ryan virus", à *Acanthamoeba castellanii*; Eldridge et Tobin (84) détectent des anticorps fixant le Complément chez trois malades porteurs d'amibes au niveau du rhinopharynx et, sur 128 malades admis à l'hôpital, 20 % sont porteurs de ces anticorps. Avec la même méthode, Saygi (191) trouve deux sérums positifs sur 33 sujets. Jadin (107), dans l'étude de 305 sérums par la méthode d'immunodiffusion, trouve dans 27,8 % des cas des anticorps vis-à-vis d'*Acanthamoeba*. Il remarque un plus fort pourcentage de positivité (39 %) chez des sujets ictériques, ou atteints d'hépatite virale.

■ Cerva (38) a eu recours à la méthode d'immunofluorescence pour identifier *Acanthamoeba culbertsoni* dans les tissus d'animaux. Depuis,

on a envisagé d'utiliser la réaction d'immunofluorescence à des fins diagnostiques. Actuellement elle ne peut être utilisée que post-mortem, pour la recherche *in situ* des amibes. Ainsi, grâce à cette méthode Stamm (232) arrive à différencier *Acanthamoeba* de *Naegleria* sur des coupes de cerveau ; mais des réactions croisées importantes semblent exister au sein des différentes espèces du genre *Acanthamoeba*.

La plupart des recherches ont débouché finalement sur l'identification et la différenciation des amibes "*Limax*" entre elles. Ces méthodes immunologiques ont aussi permis de déceler des différences plus ou moins nettes, voire même inaccessibles, à l'observation cytologique classique.

■ Apport des Méthodes immunologiques à l'Identification des Amibes libres

Quelle que soit la méthode employée, les résultats obtenus sont remarquablement concordants et permettent de dégager les conclusions suivantes.

■ Il n'existe pas de parenté antigénique entre les amibes "*Limax*", que ce soit *Acanthamoeba* ou *Naegleria*, et les amibes de la famille des *Entamoebidae*.

Cette constatation a pu être faite par plusieurs auteurs et de différentes façons.

Par la méthode d'immunodiffusion, Sen & Coll. (206) ont montré les premiers, l'absence de parenté antigénique entre *Entamoeba histolytica* d'une part, et *Naegleria gruberi* et *Schizopyrennus russelli* d'autre part. Willaert (246) fait la même constatation pour *Naegleria fowleri* et *Entamoeba histolytica*.

Par la technique d'immobilisation, Adam (2) note que les anti-sérums actifs vis-à-vis d'*Entamoeba*, n'ont aucun effet d'immobilisation sur différentes souches d'*Acanthamoeba*. L.M. et B.N. Singh (221), utilisant cette méthode, constatent qu'aucune de leurs 10 souches d'*E. histolytica* n'est immobilisée par les antisérums préparés contre cinq espèces différentes d'amibes libres.

Couplant les techniques d'immunodiffusion et d'immunofluorescence, Siddiqui et Balamuth (207) montrent l'absence de parenté antigénique entre différentes espèces d'*Acanthamoeba* et différentes espèces d'*Entamoeba*.

■ Il n'y a aucune parenté antigénique entre les genres *Acanthamoeba* et *Naegleria*.

Ce fait a été établi par Cerva (39) au moyen de la réaction de déviation du Complément, et par Cerva et Kramar (51) avec la réaction d'immunofluorescence indirecte. Willaert (246,249) arrive à la même conclusion par immunodiffusion et immuno-électrophorèse.

Au sein de la famille des *Acanthamoebidae*, la souche A1, d'*A. culbertsoni* découverte par Culbertson (63), s'individualise nettement des autres espèces du genre *Acanthamoeba* sur le plan antigénique. Néanmoins des réactions croisées existent entre les différentes espèces appartenant à ce genre.

Ainsi : Adam (2), par immobilisation, ne trouve aucune parenté antigénique entre *A. culbertsoni* d'une part, et *A. castellanii* et *A. rhysodes* d'autre part. Par contre, des réactions croisées très nettes existent entre les deux dernières espèces.

Cerva (39), par déviation du Complément, montre qu'*A. culbertsoni* est différente des souches d'*A. castellanii*, - souche Neff et souche Castellani -, alors que ces deux dernières sont très apparentées. L'immunofluorescence lui permet d'obtenir un résultat analogue (51).

Visvesvara et Balamuth (240) dans un travail récent associant l'immunodiffusion, l'immuno-électrophorèse, la fixation du Complément et la réaction d'immobilisation, redémontrent l'individualité antigénique d'*A. culbertsoni* par rapport à *A. castellanii*, *A. polyphaga*, et *A. astropyxis*, et donc, le bien-fondé de la distinction morphologique de ces différentes espèces.

Enfin, pour Balamuth et Kawakami (13) ainsi que pour Pant & Coll. (162), l'espèce *Acanthamoeba rhysodes* Singh 1952 serait apparentée à *A. culbertsoni*, bien qu'en étant distincte.

■ Les méthodes immunologiques représentent un des moyens d'approche les plus sélectifs dont nous disposons. Elles révèlent, ou simplement traduisent sur le plan protéique, des différences minimes, quelquefois impossibles à saisir au niveau morphologique.

Leur utilisation et son apport fondamental dans la distinction des différentes espèces au sein du genre *Naegleria* en offre une excellente démonstration.

α . L'immunologie confirme tout d'abord l'existence d'une espèce pathogène propre, *Naegleria fowleri*, distincte antigéniquement de *N. gruberi*, non pathogène. Cette individualité antigénique se retrouve quel que soit le moyen d'analyse utilisé.

■ Singh et Das (216) utilisant le test d'immobilisation, montrent que l'antisérum préparé contre la souche pathogène *Naegleria* HB 1 reste sans effet sur les souches de *N. gruberi*.

■ Par agglutination en présence d'un immun-sérum, Anderson et Miss Jami-
-eson (7) démontrent que des souches pathogènes de *N. fowleri* agglutinent jusqu'à la dilution sérique de 1 / 256, alors que des souches non pathogènes de *N. gruberi* mises en présence du même sérum, agglutinent seulement jusqu'à la dilution de 1 / 16. La poursuite des travaux dans ce domaine confirme que toutes les souches pathogènes, quel que soit leur lieu d'origine, sont agglutinées à la dilution de 1 / 256 (246,248).

■ Les travaux remarquables de Willaert (246) en immuno-électrophorèse révèlent que les souches *Naegleria* 0359 et 0360, isolées de LCR, se distinguent de *N. gruberi* par un minimum de 19 composants antigéniques, 8 arcs de précipitation étant communs aux deux espèces.

β . Il existe une parfaite identité antigénique entre toutes les souches de *Naegleria fowleri* quelle que soit leur origine géographique (246,248, 250).

■ Ainsi: les six souches 0359 et 0360, Vitek, HB 1, Morgan, NH 1, isolées de LCR provenant respectivement de malades en Belgique, Tchécoslovaquie, aux Etats-Unis, en Australie et en Nouvelle Zélande, présentent une structure totalement isologue en immunodiffusion et à l'immuno-électrophorèse.

■ Cerva et Kramar (51) retrouvent cette homogénéité antigénique par immuno fluorescence.

γ . Enfin, l'immunodiffusion et l'immuno-électrophorèse permettent à Willaert et Le Ray (247) de mettre en évidence une nouvelle espèce, *N. jadini*, au sein du genre *Naegleria*, et même de révéler l'existence d'autres types antigéniques tels que ceux des souches *Naegleria* sp. A 2 et *Naegleria* sp. PPMFB 6, isolées en Australie (248). Ainsi la finesse de l'analyse immuno-électrophorétique laisse deviner une extraordinaire diversité antigénique, contrastant avec l'homogénéité apparente des structures morphologiques du genre *Naegleria*.

Il est probable qu'une variabilité aussi grande existe chez d'autres genres. Aussi, pour Willaert (249), ce moyen d'analyse est appelé à jouer un rôle privilégié dans la distinction des espèces au sein du même genre. Mais la systématique amibienne est loin d'avoir atteint dans la majorité des cas, cette ultime étape de la taxonomie, puisque bien souvent les taxa supérieurs comme les genres, et même les familles, font encore l'objet de discussions. De ce fait, un moyen d'approche aussi sensible que l'immuno-électrophorèse risque de se trouver mal adapté et de compliquer à l'excès les données, au niveau de la détermination de ces échelons supérieurs qui réclament plutôt une vue d'ensemble synthétique.

En résumé, l'étude des caractères biochimiques et immunologiques est appelée à devenir l'ultime étape d'identification, puis de classification des amibes. Elle a, d'ores et déjà, permis de confirmer l'existence des différentes espèces d'*Acanthamoeba* et de démembrer le genre *Naegleria*.

Etude des Amibes libres en Microculture par Microscopie en Contraste de Phase.

Nous ne prétendons pas exposer ici une étude complète de la structure cellulaire des amibes. Nous essaierons simplement de dégager à travers la littérature, les éléments essentiels qui peuvent être étudiés dans le cadre de la méthode que nous avons utilisée : la microscopie en contraste de phase. Nous avons illustré cet exposé, soit de microphotographies prises au cours de nos propres travaux, soit de schémas que nous avons réalisés à partir d'autres de ces microphotographies.

L'examen microscopique est réalisé sur des amibes vivantes, permettant ainsi une étude tant dynamique que morphologique et biologique.

Pour plus de clarté nous distinguerons trois points malgré les interférences existant entre eux. Nous verrons la physionomie amibienne, qui est une approche dynamique de sa morphologie. Celle-ci comporte la description de l'ectoplasme et des différents types de pseudopodes, de l'endoplasme et des organites qu'il renferme. Enfin, nous décrirons les différents modes de division de ces cellules en insistant sur l'intérêt

primordial de connaître le type de mitose d'une amibe pour l'établissement d'une diagnose.

A. **Physionomie amibienne.**

L'aspect physionomique d'une amibe constitue parfois un élément important d'orientation, mais qui nécessite cependant de formuler quelques réserves.

En effet le type physionomique d'une amibe est soumis à une appréciation subjective. Il est de plus, susceptible de varier énormément en fonction du film liquidien où l'amibe évolue. Il doit donc être interprété à la lumière des conditions d'observation qui devront toujours être précisées.

En fait la silhouette morphologique d'une amibe ne se dessine nettement que lorsque celle-ci est en déplacement et présente un aspect polarisé, ce qui implique l'existence d'un film liquidien relativement épais. Ces conditions d'observation ne correspondent pas aux exigences d'un examen cytologique précis, qui requiert au contraire un film liquidien plutôt mince.

Par ailleurs, toutes les amibes ne se rattachent pas forcément à un schéma morphologique précis. Seules certaines d'entre elles présentent, au cours de leur déplacement sur le substrat, une allure plus ou moins stéréotypée.

Il vaut donc mieux ne pas accorder à ce caractère une place trop prépondérante. Certains auteurs ont essayé d'en faire la base de la classification (19,198), il s'agit là d'une attitude qui paraît condamnable (142).

■ Les types que nous avons le plus fréquemment rencontrés au cours de l'étude de nos souches appartiennent à deux catégories bien distinctes.

■ Le type "limax".

Les parasitologues ont tendance, actuellement, à employer cette expression de façon abusive en englobant sous ce vocable l'ensemble des amibes libres.

En accord avec Page (156), il faut réserver ce terme pour dé-

Figure 1. Aspects morphologiques de type "limax".
(dessinés d'après des microphotographies prises sur le vivant
(Grossissement x 1.000).

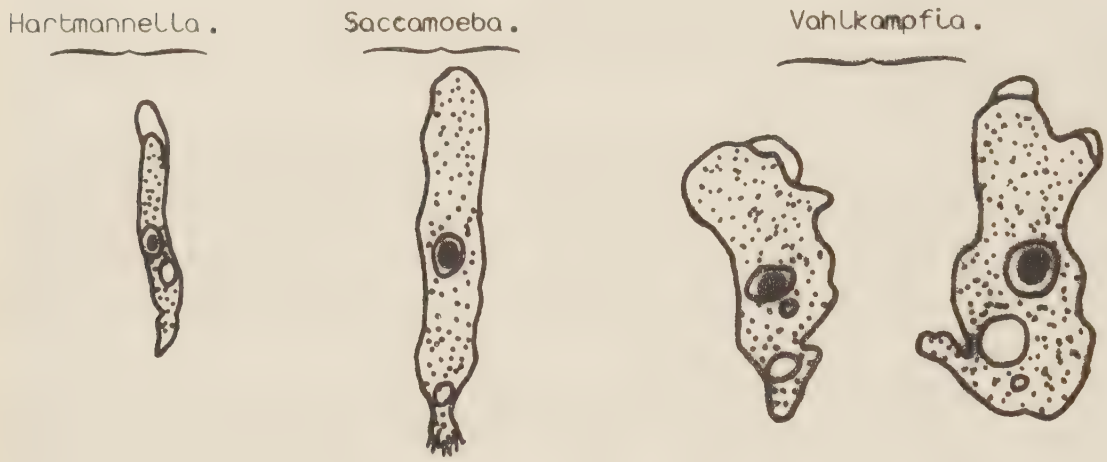
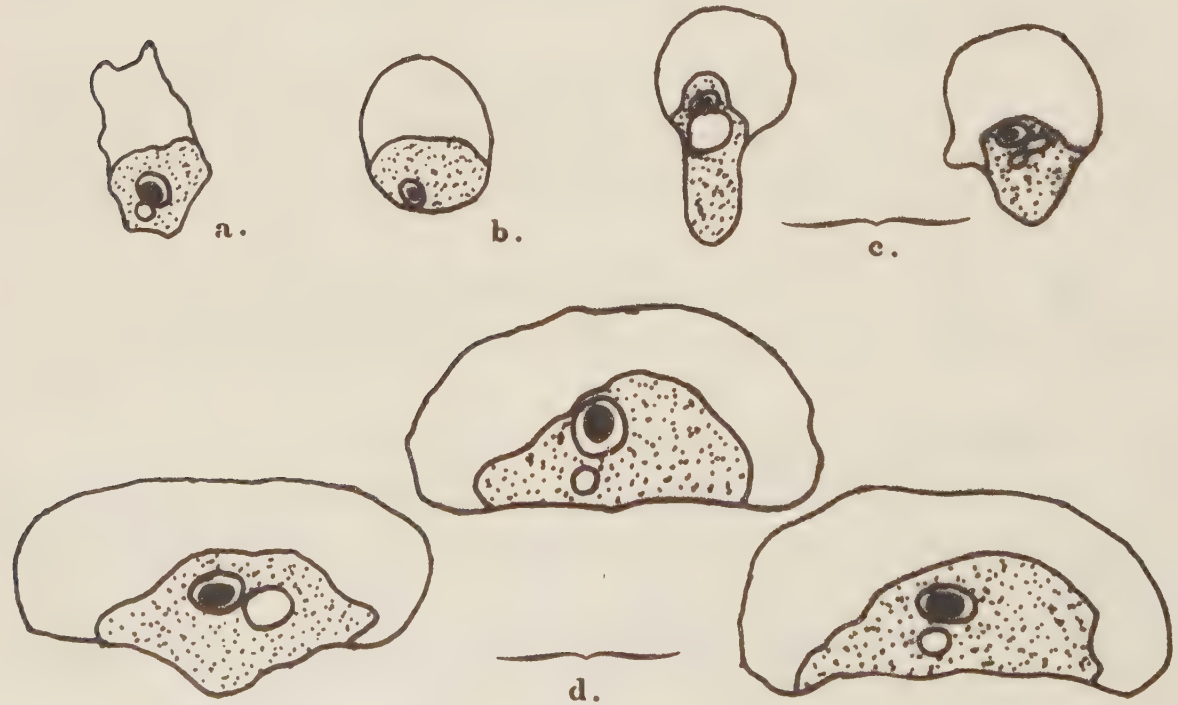


Figure 2. Aspects morphologiques de type "flabellulien".
(dessinés d'après des microphotographies prises sur le vivant
(Grossissement x 1.000).



signer essentiellement les membres de deux familles bien distinctes d'amibes libres : les Hartmannellidae et les Vahlkampfiidae. Ces deux familles rassemblent des cellules chez lesquelles la plus grande dimension correspond, en cours de déplacement, au sens de la progression.

On peut d'ailleurs distinguer sous ce type, deux aspects différents qui coïncident à peu près avec chacune de ces familles.

■ Le type "limax" vermiforme.

Le corps de l'amibe est très allongé, plus long que large : la largeur reste à peu près constante sur toute la dimension de la cellule, sauf vers l'extrémité postérieure qui va en s'amincissant.

L'aspect général est donc nettement cylindrique : il est caractéristique des genres *Hartmannella*, *Cashla*, et *Saccamoeba* (Fig.1 ci-contre).

■ Chez les Vahlkampfiidae - genres *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Tetramitus*, etc.- la plus grande dimension reste celle du sens de la progression mais le port de la cellule est moins élancé, plus ramassé.

L'activité pseudopodiale, plus intense dans cette famille, confère un aspect bulbeux notamment à l'extrémité antérieure, large et renflée par rapport au reste du corps cellulaire (Cf. Fig.1. p.34).

■ Une grande partie des souches que nous avons isolées des piscines appartient à un type morphologique tout à fait différent.

Le type "flabellulien".

Cet aspect morphologique, pas plus spécifique que le précédent, rassemble des amibes qui, à la différence du type "limax", ont tendance à s'étaler largement sur le substrat. Du fait de l'étalement du protoplasme, la plus grande dimension ne correspond pas forcément au sens de progression, elle devient même dans certains cas, perpendiculaire à celui-ci.

Chez ces amibes, la délimitation entre ectoplasme et endoplasme devient très prononcée. L'ectoplasme, en principe largement déployé à l'avant de la cellule, forme un voile qui déborde plus ou moins latéralement et évoque souvent l'aspect d'un éventail, - d'où le nom choisi -. L'endoplasme, très granuleux, se trouve nettement rejeté à la partie postérieure de la cellule où il forme une sorte de bosse : son épaisseur apparaît donc bien supérieure à celle de la lame ectoplasmique.

Ce schéma général présente, en fait, toute une gamme de contours très variables. On peut ainsi observer, suivant les cas, des formes oblongues, elliptiques, spatulées ou "en miroir à main" (Cf. Fig. 2 : a.b.c., p. 34) ; des formes semi-circulaires, chez lesquelles la bordure postérieure peut elle-même être convexe, parfaitement rectiligne, ou concave (Cf. Fig. 2 : d., p. 34).

Le plus souvent la cellule, d'une plasticité remarquable, se modifie sans cesse, évoluant d'une forme à une autre. Dans ces conditions il devient extrêmement délicat de remarquer une forme prédominante. Page s'est toutefois efforcé de le faire dans les genres *Vannella* et *Platyamoeba* (145, 158).

B. Morphologie.

Quel que soit le type physiologique d'une amibe, elle présente toujours classiquement deux zones qui sont, suivant les cas, plus ou moins bien individualisées : l'ectoplasme et l'endoplasme.

■ L'ectoplasme.

L'activité qui se manifeste à ce niveau permet à la fois les déplacements et la nutrition de la cellule.

■ Nature et Emission des Pseudopodes.

C'est à De Saedeleer (188) que l'on doit les conceptions actuelles sur les différentes sortes de pseudopodes. Cet auteur distingue l'existence de trois grands types.

■ Les pseudopodes Lobosa

De Saedeleer range dans cette catégorie tous les pseudopodes qui sont arrondis à leur extrémité, mais il propose de distinguer :

- ▶ d'une part les exolobopodes entièrement hyalins, constitués uniquement d'ectoplasme ;
- ▶ d'autre part les endolobopodes, hyalins et ectoplasmiques extérieurement, granuleux et endoplasmiques intérieurement.

■ Les pseudopodes fillosa

Filiformes, ectoplasmiques et dépourvus de granulations.

L'amincissement de ces pseudopodes leur fait atteindre

un degré de finesse extrême qui rend impossible la distinction des deux bords respectifs à l'extrémité distale. Ils peuvent donner naissance à des bifurcations généralement peu divergentes, ainsi qu'à des anastomoses. Leur résorption rapide s'accompagne de cassures "en baïonnette".

■ Les pseudopodes granulo-reticulosa

Il s'agit de pseudopodes linéaires qui se bifurquent et s'anastomosent avec facilité, leur contenu est granuleux. Ils possèdent en outre des propriétés digestives.

■ L'émission des pseudopodes peut elle-même s'effectuer de deux façons différentes.

Chez les amibes de la famille des Vahlkampfiidae, l'apparition des lobopodes est rapide et brutale, alors que chez la plupart des autres amibes, les pseudopodes sont émis lentement et sans à-coups.

Les amibes de type "flabellulien" forment rarement des pseudopodes nettement individualisés. Ces amibes paraissent glisser sur le substrat, et l'ensemble de la lame ectoplasmique est comme poussé vers l'avant. Les changements de direction s'effectuent par réorientation de la lame ectoplasmique, plutôt que par de véritables extrusions pseudopodiales.

■ Formations collopodiales.

L'extrémité postérieure d'une amibe en progression se différencie assez souvent du reste du protoplasme et forme ce que les auteurs ont appelé suivant les cas : "touffe uroïdale", "urosphère" ou "collopode".

En réalité ces termes, employés plus ou moins indistinctement, ne recouvrent pas forcément un même aspect (153,156).

■ Dans la majorité des cas il s'agit d'une houppe de filaments assez longs, qui traînent à l'extrémité terminale de l'amibe.

Ces effilochures résultent visiblement de l'étirement et du déchirement de la partie distale de l'ectoplasme, au fur et à mesure de la progression de la cellule : elles ne font que traduire l'adhérence particulière de cette zone au substrat.

Il s'agit d'un phénomène général, qui paraît lié aux propriétés de la surface cellulaire et ne représente donc pas une différenciation véritable, particulière à l'extrémité postérieure de ces amibes. La meilleu-

re preuve en est donnée par l'observation d'un déchirement tout à fait semblable en n'importe quelle zone de la cellule, chaque fois que se produit une brusque rétraction du cytoplasme, sous l'effet d'une excitation lumineuse trop intense par exemple.

■ Par contre, chez certaines amibes et notamment chez *Saccamoeba*, l'extrémité postérieure porte, à la suite d'un léger étranglement, un renflement en bulbe garni de villosités. Celles-ci sont généralement plus nombreuses, plus fines, plus courtes et plus rigides que précédemment, comparables à une "garniture en brosse" (Cf. Fig. 1, p. 34).

Cette formation ne provient pas de l'adhésion au substrat. D'ailleurs le bulbe, au cours des évolutions de la cellule, paraît détaché du support, beaucoup plus libre que ne l'étaient les filaments décrits dans le premier cas.

On peut considérer cette "urosphère" comme une véritable différenciation de l'extrémité postérieure de la cellule particulière à certains genres.

■ Phagocytose et Défécation.

La phagocytose chez les amibes peut résulter d'un banal englobement de la proie bactérienne au niveau de l'ectoplasme, avec formation ultérieure d'une vacuole digestive qui se trouve ensuite entraînée dans l'endoplasme et suit les mouvements de cyclose.

Chez certains genres on remarque en outre, l'existence d'un mode de phagocytose plus actif que le précédent, qui consiste en l'élaboration de véritables petits appareils phagocytaires tels que Pussard (172) et Page (144) en ont décrits chez les amibes du genre *Acanthamoeba*, ou chez *Pessonnella marginata* (179). La cellule émet alors deux véritables micro-pseudopodes ectoplasmiques qui vont à la rencontre de la bactérie, l'enserrent et se referment sur elle à la manière d'une pince. Nous avons également eu l'occasion d'observer ces formations chez certaines de nos souches (Cf. Planche I, n°1, p. 43).

Après achèvement de la digestion les résidus alimentaires restent enfermés à l'intérieur d'une vacuole qui, au bout d'un certain temps, fait saillie à la surface de l'ectoplasme ; cette petite hernie éclate ra-

pidement et libère les déchets alimentaires sous forme de petites boulettes ou "pelotes fécales" (Cf. Planche I, n°2 - 3 p.43).

Certaines souches, et en particulier beaucoup d'amibes d'aspect "flabellulien", sont caractérisées par une émission abondante de déchets. Les cellules laissent alors derrière elles une piste jalonnée par les boulettes fécales et, en fin de culture, la surface de la gélose en est jonchée.

■ L'Endoplasme, ses Organites et ses Enclaves.

La microscopie en contraste de phase permet de saisir les principales structures de l'endoplasme d'une amibe : noyau, vacuoles contractiles, vacuoles digestives, cristaux, mitochondries, centrioles ou éléments apparentés.

■ Le Noyau.

Les amibes libres de petite taille (< à 100 microns) sont en principe uninucléées. La multinucléarité, quand on l'observe, provient d'anomalies de la mitose, notamment d'une absence de cytodiérèse.

■ La structure du noyau des amibes libres est fondamentalement différente de celle du noyau des amibes parasites du genre *Entamoeba* (*Entamoebidae*). Chez ces dernières le noyau apparaît limité par une membrane nucléaire bien visible, bordée irrégulièrement d'une couche d'hétérochromatine d'épaisseur variable. Il renferme en son centre, un nucléole minuscule et punctiforme (Cf. Planche I, n°4 - 5 p.43).

■ Au contraire, chez les amibes libres, le noyau contient un volumineux nucléole central qui représente souvent la moitié ou plus, du sac nucléaire. Suivant les cas, il est limité par une membrane plus ou moins visible en contraste de phase (Cf. Planche I, n°2 - 3 p.43). En période interphasique on ne peut, *in vivo*, discerner la chromatine. Elle n'apparaît même pas après coloration de Feulgen si on a pris soin d'utiliser des fixateurs osmiques (172). Son apparition après l'utilisation de fixateurs acétiques doit donc plutôt être considérée comme un artefact de précipitation.

■ Cette différence de structure nucléaire entre amibes libres et amibes parasites est confirmée en microscopie électronique (31), mais elle est également parfaitement visible en contraste de phase comme en té-

moignent nos photographies.

■ L'organisation nucléaire ainsi décrite est de beaucoup la plus fréquente chez les amibes libres. Toutefois, une répartition différente du matériel nucléolaire a été rencontrée chez certaines espèces.

Le noyau renferme dans ce cas, plaqués contre la membrane nucléaire, plusieurs petits nucléoles pariétaux en nombre variable.

Cette structure nucléolaire tout à fait spéciale a été signalée chez des espèces appartenant à des genres et des familles les plus divers, comme *Thecamoeba striata* (151), *Pessonnella marginata* (179), *Platyamoeba plurinucleolus* (158), *Stachyamoeba lipophora* (159).

Parmi toutes les souches que nous avons examinées, aucune ne possédait cette disposition particulière du nucléole.

■ Les Vacuoles contractiles.

■ Celles-ci se repèrent aisément en contraste de phase grâce à leur grande transparence et à leur fonctionnement.

■ Ces formations sont, semble-t-il, constantes chez les amibes de l'eau douce, alors qu'elles font le plus souvent défaut chez les souches isolées de l'eau de mer, ainsi qu'en témoignent les nombreuses publications de Page (149,150,152,158). Tous ces exemples corroborent les travaux expérimentaux de Zuelzer (254), de Wolff (251) et de Pussard (172, 174). Ces auteurs ont montré le rôle joué par ces vacuoles dans la régulation de la pression osmotique.

Au fur et à mesure qu'on augmente la concentration saline du milieu extérieur, on note un ralentissement du rythme de la vacuole contractile qui finit même, pour des concentrations salines élevées, par cesser toute activité. A l'inverse, Page provoque l'apparition d'une vacuole contractile chez certaines espèces d'amibes marines qui en sont normalement dépourvues, en abaissant progressivement la teneur en chlorure de sodium du milieu de culture (152,158).

Les amibes parasites de l'homme et des animaux sont également dépourvues de cet organite. En effet, elles vivent dans un milieu "extérieur" isotonique.

■ La répartition de ce système de régulation osmotique dans la cellule peut présenter deux dispositions différentes.

► Il peut exister un complexe vacuolaire principal, d'emplacement déterminé au cours de la locomotion, tel que Pussard l'a décrit chez *Acanthamoeba* (172). Dans ce cas, la formation d'une ou deux vacuoles contractiles principales résulte de la croissance, puis de la coalescence de plusieurs petites vacuoles élémentaires, qui se reforment toujours après chaque systole dans une portion de territoire cytoplasmique déterminée.

Selon les espèces, ce territoire pulsatile se situe au niveau du pôle collopodial de l'amibe, - par exemple chez les *Vahlkampfiidae*, les *Hartmannellidae* -; ou à proximité du noyau, - en particulier chez beaucoup d'amibes d'aspect "flabellulien" (Cf. Planche I, n°2 - 3 p.43).

► Dans d'autres cas, au contraire, on ne peut individualiser un territoire pulsatile différencié : les vacuoles contractiles sont réparties dans la totalité de l'endoplasme où elles paraissent se former au hasard et fonctionner de manière indépendante.

■ Le devenir de ces vacuoles varie au cours des phénomènes de multiplication.

► Chez les amibes se divisant par métamitose, l'accélération du rythme de la vacuole contractile caractérise la prophase, alors qu'au moment de l'anaphase il y a arrêt provisoire de son activité. Ce sont là des phénomènes généraux signalés par Wolff (251), puis par Pussard (171,172) sur *Acanthamoeba*.

► Chez les amibes se divisant par promitose, il semble persister tout au long de la division, un semis de vacuoles éparpillées dans le cytoplasme.

■ Les Vacuoles digestives.

D'une transparence plus faible que les précédentes, elles se repèrent moins aisément en contraste de phase.

Généralement nombreuses, elles renferment suivant les cas, une à plusieurs bactéries ou des résidus alimentaires.

Planche I.

Photographies n° 1 à n° 6 : microphotographies prises sur le vivant en en contraste de phase.

Photographies n° 7 & n° 8 : microphotographies prises sur le vivant en contraste de phase "Anoptral".

Grossissement : n°1 et n°6 (x 1500) - n°2 à n°5 (x 945) - n°7 et n°8 (x 945)

■ Photographie n°^[1] : Phagocytose (souche RH₅d).

Les flèches indiquent la présence d'appareils phagocytaires.
Remarquer également la formation de vacuoles de phagocytose.

■ Photographies n°^[2] n°^[3] : Enclaves habituelles d'une amibe (souche RH₉b) au microscope en contraste de phase.

Remarquer la lame ectoplasmique, le noyau, la vacuole pulsatile, ainsi que le phénomène de défécation aboutissant à l'élimination d'une "pelote fécale".

■ Photographies n°^[4] n°^[5] : Amibe du genre Entamoeba.

Remarquer la structure différente du noyau.

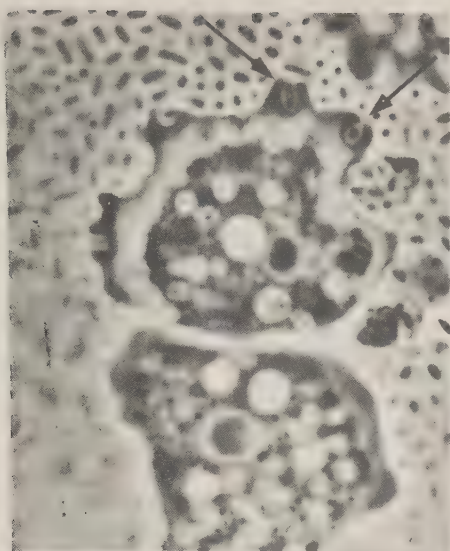
■ Photographie n°^[6] : Amibe du genre Saccamoeba (souche LU₄a).

Cliché montrant la présence de cristaux indiqués par les flèches.

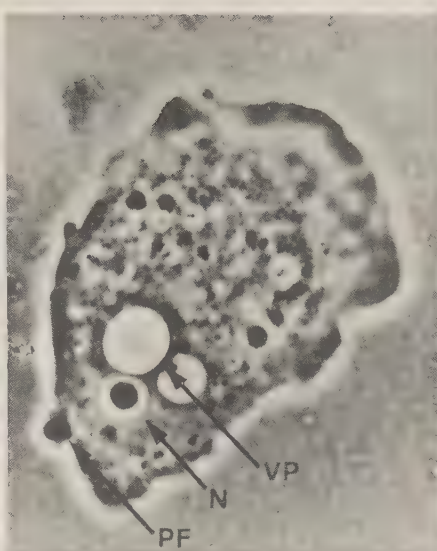
■ Photographies n°^[7] n°^[8] : Formes flottantes radiées (souches RH₃b & RH₅d)

Légendes apparaissant en regard des flèches :

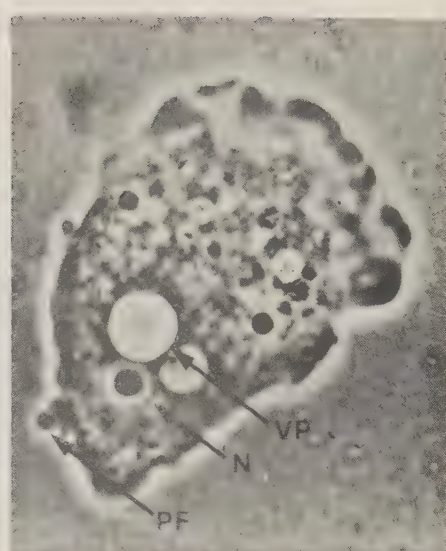
[N] = noyau ; [V.P.] = vacuole pulsatile ; [P.F.] = pelote fécale



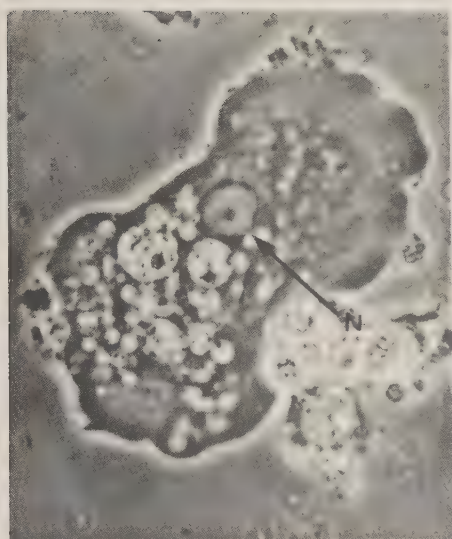
1



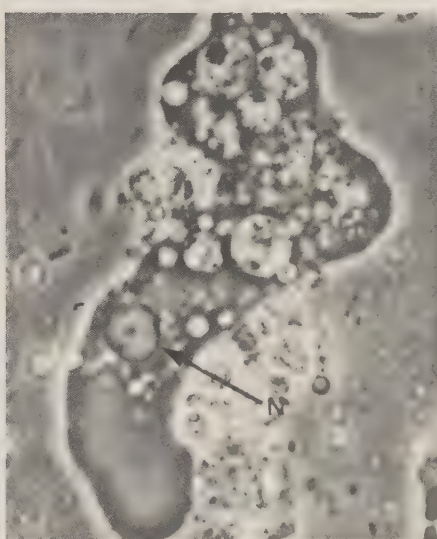
2



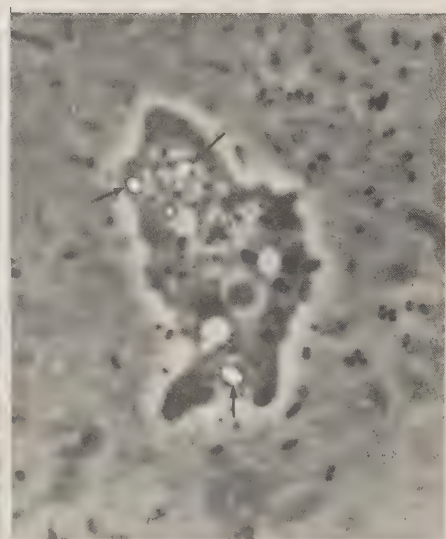
3



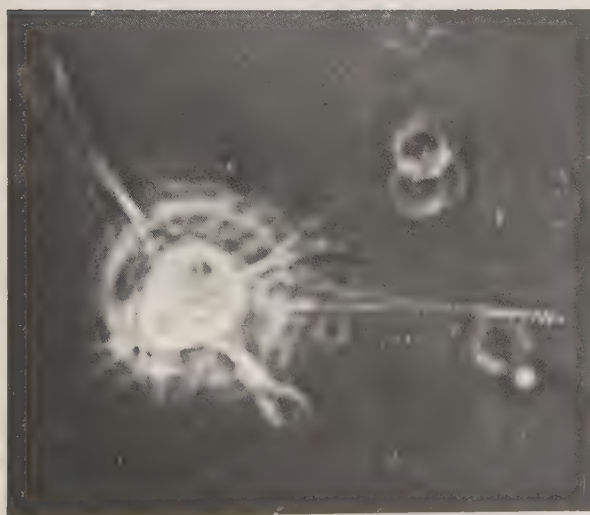
4



5



6



7



8

■ Les cristaux.

La présence éventuelle de cristaux dans l'endoplasme se remarque facilement en contraste de phase : ils se signalent par leur très forte réfringence et leur forme géométrique quadrangulaire.

Ces enclaves cristallines sont toutefois d'observation peu fréquente. Page retrouve des cristaux chez certaines espèces du genre *Saccamoeba* comme *S. limax* (146), alors qu'ils semblent faire défaut chez d'autres comme *S. stagnicola* (156).

Parmi les souches que nous avons observées, la présence de cristaux paraît surtout être une caractéristique du genre *Saccamoeba*, puisque sur 4 souches isolées appartenant à ce genre, 3 en renfermaient (Cf. Planche I. n°6 p. 43).

■ Equivalent centriolaire.

En l'état actuel des recherches il semble que les amibes soient dépourvues d'un véritable centriole, du moins sous sa forme habituelle. Les études réalisées en microscopie électronique sur *Acanthamoeba* par Deutsch (75), Vickerman (237), Rondanelli & Coll. (187), n'en font jamais mention. Même les amoebo-flagellates comme *Naegleria*, paraissent dépourvus d'une telle structure sous leur forme amiboïde (89,201,237).

Cependant, Pussard a parfaitement démontré par une observation attentive en contraste de phase, qu'il existe chez toutes les espèces du genre *Acanthamoeba* un organite particulier - ou "centrosphère" - situé près du noyau, se comportant pendant la mitose comme un centrosome (172,173,175, 177,180). Cette formation, dont l'existence est maintenant indéniable grâce aux documents photographiques produits, avait déjà été repérée dès 1935 par Comandon et De Fonbrune (61) ; elle est cependant passée inaperçue à la majorité des auteurs (2,138,144,214,216). Elle n'a reçu qu'une seule confirmation en microscopie électronique, avec le travail de Bowers et Korn (25) qui décrivent chez *A. castellanii*, une zone dense entourée de microtubules qu'ils considèrent comme un équivalent centriolaire. Cet exemple précis montre bien que le simple examen microscopique, sous réserve qu'il soit réalisé dans de bonnes conditions, n'a rien perdu de son intérêt par rapport aux techniques de plus haute performance.

■ Les Mitochondries.

L'examen microscopique en contraste de phase permet de discerner ces éléments dans certains cas favorables. Les amibes de la famille des Vahlkampfiidae en particulier se prêtent bien à leur observation.

Très nombreuses, elles apparaissent in vivo sous forme de bâtonnets "en haltères", - chondriocontes -, renflés aux extrémités.

La microscopie électronique montre qu'elles constituent un des éléments majoritaires de l'endoplasme, aussi bien chez *Acanthamoeba* que chez *Naegleria* et *Vahlkampfia* (201,237).

Alors que les mitochondries de *Naegleria gruberi*, en microscopie électronique, présentent surtout des formes rondes ou ovales, Carter, Lastovica, Martinez & Coll. remarquent une nette prédominance de formes en cupules et en haltères chez *Naegleria fowleri* (34,125,132) et, pour ces auteurs, ces formes seraient caractéristiques de l'espèce pathogène.

C. Division.

La mitose, chez les amibes, constitue un élément très important d'identification : elle doit être soigneusement étudiée pour l'établissement d'une diagnose.

Une amibe en division offre à l'examineur, dans un grand nombre de cas, des caractères précis, stables dans le temps et l'espace, d'autant que, pour une espèce déterminée, la mitose se reproduit d'une façon toujours semblable. Cette reproductibilité est d'un avantage considérable chez ces cellules qui, du fait de l'amoeboïsme, sont en perpétuel remaniement, et qui, par leur absence de structure cytosquelettique particulière, se prêtent mal à l'établissement de caractères différentiels.

En outre, si la description des amibes est rendue difficile par l'homogénéité relative des caractères morphologiques, les caractères mitotiques s'avèrent, eux, paradoxalement plus diversifiés chez les Amoebiens que chez aucun des autres sous-embranchements de Protozoaires.

Dès 1910, Chatton (55), exploitant cette diversité, distingue trois types mitotiques chez les Amoebiens, la promitose, la mésomitose,

METAMITOSE

MESOMITOSE

PROMITOSE

Noyau interphasique				
Prophase				
Métaphase				
Anaphase				
Télophase				

Retour de
la chromatine
à l'état
dispersé

Reconstitution
du noyau-
fils

Figure 3. Comparaison des différents types de division chez les amibes (Amoebiens)

et la métamitose, selon le comportement du nucléole et la position intra ou extra-nucléaire du centrosome.

Mais nous avons vu que la majorité des amibes sont dépourvues de cet **organite** ou que sa mise en évidence, lorsqu'il existe, reste délicate. Pussard (178) a donc récemment proposé de conserver les distinctions établies par Chatton (55,57) tout en modifiant légèrement leur contenu.

Nous nous proposons de rappeler les caractères essentiels de chacun de ces trois types mitotiques tels que Pussard les a redéfinis et dont le déroulement peut être suivi en contraste de phase sur des cellules vivantes.

■ La Promitose. (Cf. Figure 3, p.47)

Ce mode de division s'oppose aux deux suivants par la conservation du nucléole tout au long de la mitose. Il se caractérise également par la persistance de la membrane nucléaire et par le maintien des mouvements amoeboïdes jusqu'à un stade avancé de la division.

■ La prophase est marquée par un allongement progressif du nucléole, qui s'étire et finit par s'étrangler dans sa partie médiane. Le nucléole revêt alors l'aspect d'une figure "en sablier".

A partir de ce stade, le contraste de phase permet quelquefois de deviner l'apparition de la chromatine de part et d'autre du rétrécissement médian.

A la fin de la prophase, les deux masses nucléolaires ne sont plus reliées que par un fin filament qui finira par se rompre.

■ La figure métaphasique est caractérisée par la présence, à chaque extrémité du noyau, des deux masses ou "corps polaires" provenant de la scission du nucléole. La plaque équatoriale placée entre eux et au centre du noyau, devient en principe nettement visible.

Au cours de ces deux premières étapes la membrane du noyau, persistante, délimite de façon distincte l'espace nucléaire par rapport au cytoplasme environnant. D'autre part, la cellule en division continue à se déplacer normalement, sans aucun ralentissement de l'activité pseudopodiale.

■ L'anaphase permet d'examiner la scission de la plaque équatoriale, suivie de l'ascension des deux lots de chromosomes-fils, surmontés chacun d'un corps polaire, vers les deux pôles opposés du noyau.

En fin d'anaphase, le grand allongement du noyau provoque un étranglement de la membrane nucléaire toujours persistante, tandis que la cellule ralentit considérablement ses mouvements, sans acquérir toutefois un contour vraiment arrondi.

■ Au cours de la télophase, l'étirement maximum du noyau entraîne la rupture de la membrane nucléaire dans sa partie médiane. A ce stade, l'évolution de la chromatine sur le vivant devient très difficile à suivre, sans doute par suite de son retour à l'état dispersé. Par contre, à chaque extrémité de la cellule, les deux corps polaires, qui représentent les futurs nucléoles des deux cellules-filles, restent parfaitement apparents.

En même temps que s'effectue la cytodiffrèse, la membrane nucléaire se reconstitue autour des deux nouveaux noyaux qui reprendront rapidement l'aspect habituel.

Cette promitose, dont nous venons de rappeler les grandes lignes, correspond en fait au mode de division de la famille des Vahlkampfiidae, genres *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Tetramitus*.

Pussard (178) pense qu'il faut inclure en plus dans ce mode mitotique, toutes les divisions où l'on constate la perennité du nucléole et sa répartition sensiblement égale entre les deux noyaux-fils. Cette nouvelle conception n'implique pas forcément la formation de corps polaires et élargit donc le cadre de la promitose à des divisions où le nucléole subsiste mais évolue autrement : *Thecamoeba terricola*, *Sappinia* sp., (178).



Les deux autres modes mitotiques observés chez les amibes s'opposent à la promitose par l'évolution du nucléole qui disparaît au cours de la prophase. Ces mitoses se rapprochent donc du mode de division connu chez les cellules supérieures : ce sont la mésomitose et la métamitose.

■ La Mésomitose. (Cf. Figure 3, p.47)

Cette division, redéfinie par Pussard à l'occasion de la a description d'une nouvelle espèce, *Pessonnella marginata* (179), se caractérise par la disparition du nucléole et par la persistance de la membrane nucléaire à un stade avancé de la mitose : au moins jusqu'au début de l'anaphase.

Nous donnerons un exemple de ce mode mitotique à l'occasion de l'étude d'une de nos souches.

■ Le début de la **prophase** est marqué par l'effacement du nucléole et par un léger gonflement du volume nucléaire. Après la disparition du nucléole le noyau peut rester optiquement vide quelques instants, nettement limité par sa membrane .

■ Celle-ci demeure visible à la **métaphase**, alors que se forme déjà la plaque équatoriale.

■ La membrane nucléaire est toujours présente lorsque débute l'**anaphase** mais, à la fin de cette étape, l'allongement du noyau provoque peu à peu un étirement tel, qu'en fin d'anaphase il devient impossible de l'individualiser.

■ A la **télophase** le matériel chromatinien, transposé aux deux pôles de la cellule, devient de plus en plus ramassé et son évolution ultérieure échappe peu à peu à l'observation sur le vivant.

Alors que la cytodierèse est déjà bien avancée, voire même achevée, les noyaux-fils se repèrent de nouveau grâce à la reconstitution de la membrane nucléaire et à l'apparition de quelques grains nucléolaires qui fusionnent ensuite pour redonner le nucléole central..

■ La Métamitose. (Cf. Figure 3, p.47)

Le comportement nucléolaire est identique à celui indiqué dans la mésomitose, mais la métamitose se différencie par une disparition plus précoce de la membrane nucléaire.

■ Comme dans le cas précédent, le nucléole s'estompe progressivement à la **prophase**, tandis que la membrane nucléaire disparaît également, soit à la fin de la prophase, soit au début de la **métaphase**. A partir de cet instant, la suite de la division se déroule donc au sein même du cytoplasme : la

plaque équatoriale, l'ascension anaphasique, sont en contact direct avec l'endoplasme.

► La distinction entre ces deux modes mitotiques peut en principe se faire sur le vivant car il n'existe plus, comme lors de la mésomitose, de délimitation très nette entre les granulations de l'endoplasme et le suc nucléaire hyalin du fait de la disparition de la membrane nucléaire.

► Hormis cette différence importante, la métamitose ne présente pas de particularités notables et l'évolution mitotique est, dans ses grandes lignes, identique à celle décrite pour la mésomitose.

► La métamitose devient même identique à la division telle que nous la connaissons chez les cellules de Métazoaires lorsqu'il existe un équivalent centriolaire comme la centrosphère retrouvée par Pussard chez *Acanthamoeba*.

Celle-ci se dédouble alors à la prophase, occupe les deux pôles opposés du noyau, et se comporte comme un véritable centriole pendant toute la division, servant de points d'attache au fuseau.



Enfin, le comportement cellulaire durant la mitose fait l'objet d'une opposition très nette entre les amibes se divisant par promitose d'une part et celles se divisant par méso ou métamitose d'autre part.

Dans le premier cas les amibes continuent à se mouvoir normalement jusqu'à un stade avancé de la division, - pratiquement jusqu'à l'anaphase -, alors que, dans le second cas, l'entrée en division s'accompagne d'un arrêt de la locomotion. La perte de la polarisation est concomitante à la disparition du nucléole : l'amibe adopte un contour presque circulaire, qui persistera jusqu'à la fin de l'anaphase pour devenir alors plutôt elliptique en même temps que s'amorce le sillon de cytodiérèse.

Parmi les souches que nous avons examinées, aucune n'a souffert d'exception à cette règle.



■ La différenciation de ces types mitotiques en contraste de phase sur le vivant est généralement possible dans la majorité des cas. Cependant, nous avons rencontré des difficultés à l'occasion de l'étude de la mitose de certaines souches, en particulier chez *Saccamoeba*, ou chez quelques souches d'aspect "flabellulien" qui se prêtent moins bien que d'autres à cette méthode d'observation. Dans ce cas, la mise en oeuvre de colorations cytochimiques (Feulgen) est alors particulièrement indiquée pour venir suppléer l'étude sur le vivant.

■ Nous terminerons ce rappel sur les modalités de la division chez les amibes en signalant que la plupart des auteurs de langue anglaise utilisent les mêmes termes sans toutefois leur donner la même signification que Pussard.

Page, bien qu'il vienne de reconnaître récemment l'existence de ces trois modes mitotiques (161), n'en a utilisé que deux jusqu'à présent : promitose et mésomitose. La promitose, pour lui, correspond classiquement à la mitose vahlkampfienne selon Chatton. Elle représente effectivement le type de promitose le plus rencontré, mais nous avons vu que Pussard a élargi cette conception pour tenir compte de cas particuliers.

Les plus grandes divergences, et donc les plus grands risques de confusion pour le lecteur, portent sur la mésomitose. Page rassemble en effet pêle-mêle sous ce terme, toutes les amibes non promitotiques dont le nucléole disparaît à la prophase. Cet auteur n'accorde donc pas la même valeur taxonomique que Pussard au phénomène de persistance de la membrane nucléaire. Pourtant il a pu observer ce caractère à diverses reprises sur des amibes très différentes comme *Hartmannella limax*, *Thecamoeba striata*, *Platyamoeba flabellula*, *Stachyamoeba lipophora* (146,151,158,159). Il est donc obligé d'admettre l'extrême variabilité qui existe au sein de son "mode mitotique général commun" (154).

Singh, pour sa part, simplifie exagérément les données. Selon le comportement du nucléole, présent ou non au cours de la mitose, l'auteur ne distingue que deux modes de division qui deviennent pratiquement les deux seuls critères de sa classification (213,214,216,219).

Quant à Bovee et Jahn, ils négligent délibérément toute étude de la mitose pour échauffer une classification basée exclusivement sur l'aspect morphologique et la locomotion (19,23,24).

■ Nous pensons, pour notre part, que l'étude de la mitose chez les amibes est du plus grand intérêt pour l'établissement de distinctions taxonomiques. En dehors de l'existence des trois grands modes mitotiques tels qu'ils ont été redéfinis par Pussard, il est possible de découvrir chez chacun d'eux, des variations et des particularités qui sont autant de précieux critères pour la caractérisation des genres ou des espèces ainsi que nous nous efforcerons de le montrer. Il apparaît peu admissible que, de nos jours, tant d'espèces soient encore créées sans que l'on en ait observé la mitose.

Essai de Systématique amibienne.

Il n'existe pas encore de classification définitive et valable des amibes. Cet état de fait tient sans doute aux difficultés particulières qui s'attachent à l'étude des rhizopodes. Nous les avons déjà évoquées à plusieurs reprises.

Nous épargnerons au lecteur les détails et les discussions permanentes sur le bien-fondé de l'existence, ou de la distinction, de deux espèces, de deux genres, voire même de deux familles. Ces querelles ne font sans doute que retarder la progression de nos connaissances sur les amibes. On peut cependant retenir que, selon le choix des critères pris en considération, les auteurs ont abouti à des essais de classification totalement différents et inconciliables.

Schématiquement, deux tendances se sont souvent opposées. Certains auteurs comme Schaeffer (198), Bovee et Jahn (19,23,24) accordent une importance primordiale aux pseudopodes et à la morphologie amibienne. A l'opposé, d'autres, comme Singh et Das (214,216), attribuent une place prépondérante au noyau et au déroulement de la mitose qui devient la base de la classification.

Page (142,161), voulant éviter ces deux attitudes excessives, essaie d'adopter une position intermédiaire tenant compte à la fois des caractères morphologiques et mitotiques.

Ces tentatives discordantes ont finalement engendré chaos et confusion dans la systématique amibienne. Page et Bovee (161) s'accordent pour reconnaître qu'il faut interpréter ces essais de systématique plus

comme une mise au point provisoire, bénéficiant des dernières connaissances acquises, que comme un cadre rigide et absolument définitif. Pussard (178) résume la situation en écrivant : "- La connaissance des amibes est encore trop fragmentaire pour qu'il soit possible de proposer une classification d'ensemble. Actuellement la tâche prioritaire consiste à décrire de manière aussi exhaustive que possible les clones que nous isolons."

Nous nous sommes efforcé de respecter cet enseignement en réalisant l'étude de quelques-unes de nos souches. En effet, devant l'importance des lacunes, il semble prématuré de procéder à un travail de classement, la plupart des données étant souvent fragmentaires, ou sommaires.

Nous pensons néanmoins qu'il est indispensable de donner ici un essai de classification, ne serait-ce que pour mieux situer les genres et les espèces en cause et les replacer dans un contexte d'ensemble.

Nous choisirons la systématique établie récemment par Page (161) qui, d'après son auteur, a l'avantage de correspondre à une tentative d'approche synthétique tenant compte à la fois des données morphologiques et mitotiques.

L'auteur ayant limité son essai de classification aux amibes nues émettant des lobopodes, Sous-classe Lobosia, il nous paraît indispensable de l'élargir, en accord avec le Comité de Taxonomie de la Société de Protozoologie (100), aux amibes présentant un des deux autres types pseudopodiques précisés par De Saedeleer (188), c'est-à-dire les types filosa, ou granuloreticulosa.

Embranchement :

PROTOZOA Haeckel 1866

Classe Rhizopodea Von Siebold 1845

Sous - Classe : Lobosia Carpenter 1861

1

Pseudopodes lobés ou plus ou moins filamenteux, mais produits alors par un lobe plus large et hyalin, non anastomosés.

Habituellement uninucléées.

Ordre : Amoeblida Kent 1880

Uninucléées.

Mitochondries présentes.

Pas de courants cytoplasmiques bidirectionnels.

Pas de stades flagellés connus.

Sous - Ordre :

Tubulina Bovee et Jahn 1966

- Corps cylindrique ramifié ou non.
- Calotte cytoplasmique, présente ou non, à l'extrémité des pseudopodes.
- Division nucléaire par mésomitose (selon Page).

Famille

Amoebidae Diesing 1848

Habituellement plusieurs pseudopodes d'extrémité hémisphérique et avec une calotte ectoplasmique.

Les pseudopodes des formes flottantes radiées restent granuleux sur la plus grande partie de leur longueur et ne s'amincissent pas.

Noyau dont le nucléole granuleux est réparti contre la membrane nucléaire.

Si la locomotion est monopodiale, le noyau, les pseudopodes et les formes flottantes sont alors caractéristiques de la Famille.

Genres :

- Amoeba
- Polychaos
- Chaos
- Trichamoeba
- Hydramoeba

Famille

Hartmannellidae Volkinsky 1931, emend. Page 1974

Amibes monopodiales dont la locomotion s'effectue par un écoulement calme et régulier du cytoplasme, parfois avec de légères émissions pseudopodiales hémisphériques bombant alternativement de chaque côté de l'extrémité antérieure.

Noyau vésiculaire, avec un unique nucléole central.

S'ils existent : kystes uninucléés, - souvent binucléés dans un des genres.

- Genres :
- Hartmannella
 - Saccamoeba
 - Cashia
 - Glaeseria
 - Rhizamoeba

Famille

Entamoebidae Chatton 1925

Amibes monopodiales.

Noyau dont le nucléole est réduit à un petit granule punctiforme (Cf.

Planche I. n°4-5 p.42), ou à un groupe de granules.

S'il existe, kyste mûr à 4, 8 noyaux, - ou plus -, résultant de divisions à l'intérieur du kyste.

Toutes les espèces connues, sauf une, sont parasites.

- Genres :
- Entamoeba
 - Endamoeba
 - Iodamoeba
 - Endolimax



Sous - Ordre :

Thecina Bovee et Jahn 1966

- Amibes étalées sur le substrat, de forme souvent oblongue, ovale, ou flabellulienne, au contour plus ou moins régulier avec, souvent, une zone ectoplasmique bien développée.
- Souvent recouvertes d'une sorte de pellicule distincte, qui peut être plissée.
- Déplacement par un mouvement de roulement.
- La plupart des espèces ne présentent jamais de ramifications.
- Divers modes de division nucléaire.

Famille

.....
: Thecamoebidae Schaeffer 1926 :
.....

Avec les caractères du Sous - Ordre.

Genres :

- Thecamoeba
- Sappinia
- Platyamoeba
- Pessonnella
- Vannella
- Unda



Sous - Ordre :

Flabellina subord. nov.

- Amibes largement étalées, avec une zone ectoplasmique étendue, de forme quelquefois discoïde.
- Pas de pellicule visible.
- Le déplacement s'accompagne souvent de légère éruption, ou du roulement, de la totalité du cytoplasme.
- Division nucléaire mésomitotique (selon Page) quand elle est connue.

Famille : Flabellulidae Bovee 1970

Pas d'émission de sub-pseudopodes durant la locomotion.

Forme souvent irrégulière et rapidement changeante, quelquefois spatulée ou flabellée.

Souvent : écoulement cytoplasmique éruptif.

Genres : ● Flabellula
● Rosculus

Famille : Hyalodiscidae Poche 1913

Forme complètement discoïde, ou un peu en éventail, plus large que longue, avec une bosse endoplasmique granuleuse en position centrale ou postérieure, entourée complètement, ou antérieurement et latéralement, par la bordure ectoplasmique étalée.

Quelquefois des sub-pseudopodes ectoplasmiques étroits et côniques.

Mouvement par roulement où se trouve impliquée la totalité du cytoplasme.

Genres : ● Hyalodiscus
● Flamella



Sous - Ordre :

Conopodina Bovee et Jahn 1966

- Sub-pseudopodes hyalins, digitiformes ou mammiformes, à peu près côniques, émis par une large zone hyaline.
- Formes en déplacement : toujours plus longues que larges, non arrondies.
- Formes flottantes : souvent, mais pas toujours, radiées, avec des pseudopodes hyalins minces, finement effilés.
- Forment rarement des kystes.
- Division nucléaire méso-mitotique (selon Page), mais avec la possibilité de structures polaires chez certaines espèces.

Famille	
:	Paramoebidae Poche 1913 :
	

Avec les caractères du Sous - Ordre.

Genres :

- Paramoeba
- Mayorella
- Vexillifera
- Subulamoeba
- Oscillosignum
- Dinamoeba
- Trinamoeba
- Pontifex



Sous - Ordre :

Acanthopodina subord. nov.

- Sub-pseudopodes hyalins plus ou moins pointus, quelquefois filamenteux, souvent fourchus, produits par une zone ectoplasmique plus large.
- Pas de formes régulièrement discoïdes bien que parfois étalées sur le substrat.
- Forment habituellement des kystes.
- Division nucléaire par mésomitose ou métamitose (selon Page)

Famille : Acanthamoebidae Sawyer et Griffin 1975

De quelques-uns à plusieurs pseudopodes (acanthopodes), habituellement pointus mais parfois émoussés.

Contour de l'amibe en déplacement : ovale, plus ou moins triangulaire, allongé, ou irrégulier.

Centrosphères extranucléaires.

Kystes polyédriques ou grossièrement biconvexes.

Présence de cellulose dans la paroi, qui se compose d'une enveloppe interne plus ou moins polygonale, ou étoilée, et d'une enveloppe externe plus ou moins plissée.

Dékystement par déplacement d'un opercule aux points de contact entre les deux enveloppes du kyste.

Genre : ● Acanthamoeba

Famille : Echinamoebidae Page 1975

De quelques-uns à plusieurs sub-pseudopodes finement effilés, filiformes, ou épineux.

Amibes plus ou moins étalées au cours du déplacement mais qui ne sont pas dotées d'une bordure ectoplasmique sur tout leur pourtour.

Les espèces connues forment des kystes, mais sans paroi interne polygonale ou étoilée.

Le dékystement n'a pas lieu par déplacement d'un opercule.

Genres : ● Echinamoeba
● Stachyamoeba
● Filamoeba



Ordre : Schizopyrenida Singh 1952

Corps cylindrique monopodial (limax).
Le déplacement s'effectue habituellement par des pseudopodes lobés hyalins, fortement éruptifs.
Amibes uninucléées.
Division nucléaire par promitose.
Stades flagellés temporaires communs.

Famille : Vahlkampfiidae Jollos 1917, Zulueta 1917

Caractères de l'Ordre.

- Genres :
- Vahlkampfia
 - Naegleria
 - Adelphamoeba
 - Tetramitus
 - Heteramoeba



Ordre : Pelobiontida

Corps à peu près cylindrique, ou elliptique, monopodial.
Courant cytoplasmique bidirectionnel fréquent.
En principe multinucléées.
Mitochondries absentes, mais présence de bactéries-symbiontes.
Renferment souvent des particules minérales et végétales.
Pas de stade flagellé connu.

Famille : Pelomyxidae Schulze 1877

Caractères de l'Ordre.

- Genre :
- Pelomyxa



Sous - Classe : Filosia Leidy 1879

2

Pseudopodes du type "filosa" au sens strict, très effilés et ramifiés, éventuellement anastomosés.

Ordre : Aconchulinida De Saedeleer 1934

Amibes nues.

Genre : ● Penardia



Sous - Classe : Granuloreticulosia De Saedeleer 1934

3

Amibes à pseudopodes "granulo-reticulosa", filamenteux, granuleux, anastomosés.

Ordre : Athalamida Haeckel 1862

Amibes nues.

Pseudopodes pouvant être émis en n'importe quel point du pourtour cellulaire.

Genres : ● Arachnula
● Blomyxa
● Gymnophrys
● Pontomyxa



Chapitre III

Travaux personnels

Un tel travail ne peut aboutir au bout de trois ans, qu'à un ensemble de résultats fragmentaires souvent sans liens apparents. Ils sont cependant le résultat de très nombreuses heures d'observation microscopique, unique moyen pour obtenir une illustration satisfaisante de nos descriptions.

■ Nous décrirons d'abord les principales méthodes utilisées au cours de ce travail avant d'effectuer une mise au point globale sur l'ensemble de nos prélèvements. Enfin nous envisagerons de manière plus précise les résultats obtenus sur différents ensembles de souches appartenant selon les cas, à un même genre, à une même famille, ou se rattachant simplement à un même aspect morphologique.

■ Ainsi nous aborderons, dans un premier temps, le pouvoir pathogène des souches d'*Acanthamoeba* isolées. Nous ferons ensuite une étude des modalités mitotiques observées chez des souches de la famille des *Vahlkampfiidae*, et chez plusieurs souches d'aspect flabellulien.

■ Parmi toutes les souches identifiées, nous consacrerons une étude plus approfondie à *Nuclearia simplex*, *Vexillifera* sp., et à *Comandonia operculata* n.g. n.sp., qui est décrite pour la première fois dans la nomenclature à notre connaissance.

Dans la mesure du possible et par esprit didactique, nous avons gardé dans cette étude le plan qui a présidé à notre revue bibliographique, à savoir : la morphologie cellulaire, ectoplasme et endoplasme, la morphologie kystique, et le déroulement de la mitose.

Ces données peuvent paraître à première vue hétéroclites et sans relation entre elles. La raison en est trouvée dans la diversité des souches isolées et dans les possibilités multiples offertes par ce genre de recherches. Nous avons du faire un choix parmi toutes les observations accumulées. Nous l'espérons judicieux.

M o y e n s d ' é t u d e .

A. Méthodes pour l'Etude qualitative des Amibes.

Prélèvements.

Nous avons effectué tous nos prélèvements à l'intérieur même des bassins de natation sauf trois d'entre eux réalisés à la surface des filtres à sable des piscines. Les flacons de prélèvement étaient au préalable stérilisés à la chaleur sèche 3 heures à 180°C. Le volume d'eau analysée correspondait chaque fois à un litre. Les bassins ont été explorés en différents endroits et à des profondeurs variables.

Pour nous assurer de la parfaite homogénéité de l'eau, nous nous sommes efforcé de pratiquer les prélèvements à des moments où celle-ci présentait un brassage maximum en raison de la fréquentation importante de la piscine. A deux reprises, ces conditions n'étant pas remplies nous avons dû prélever dans des bassins parfaitement calmes. Les résultats ont cependant été positifs. Un de nos échantillons, prélevé 48 h. après le nettoyage trimestriel réglementaire du bassin, c'est-à-dire la vidange et le brossage des parois, a également permis de retrouver des amibes.

Isolement des Amibes.

Les échantillons d'eau sont soumis dès leur arrivée au laboratoire, à une filtration sur membrane de nitrate de cellulose (porosité Ø 1,2 microns). L'appareil de filtration ainsi que sa membrane sont au préalable stérilisés à l'autoclave 30 mn à 120°C.

La filtration terminée, la membrane est aussitôt découpée en deux : chaque moitié est déposée en la retournant à l'envers, à la surface d'une boîte de Pétri contenant une mince couche de gélose enduite d'une suspension d'*Aerobacter aerogenes*. Toutes ces manipulations sont effectuées stérilement et le matériel utilisé, - ciseaux, pinces, etc. -, est stérilisé 3 heures à 180°C.

Les deux boîtes de Pétri contenant les deux demi-membranes sont ensuite scellées au "Parafilm" et déposées à l'envers dans une étuve à 28°C.

On examine alors chaque boîte à intervalles réguliers à l'aide

d'un microscope inversé (Grossissement x 160) pour surveiller l'apparition éventuelle d'amibes, ou d'autres micro-organismes.

La prolifération des amibes est généralement apparente au cours de la première semaine : à défaut de cette observation, et avant de conclure à un résultat négatif, toutes ces membranes sont conservées à l'étuve pendant un mois au moins.

■ Séparation des Souches - Clonage.

La plupart des prélèvements fournissent des mélanges d'espèces différentes, quelquefois repérables, avec l'habitude, dès le Grossissement x 160. Ces formes végétatives, ou ces "kystes", sont étroitement mêlés les uns aux autres. En raison de leur contiguïté et de leur taille microscopique, leur séparation s'avère délicate. On peut recourir à différents procédés.

■ On cherche à réaliser une dissémination beaucoup plus large des éléments en présence.

Pour ce faire il est nécessaire de prélever à l'aide d'une micropipette de verre, les kystes et les formes végétatives qui seront ensuite dispersés au maximum à la surface d'un milieu gélosé vierge. Cette étape intermédiaire de "répartition" se réalise sous contrôle microscopique.

■ Pour isoler et cloner les différentes souches, on peut recourir à plusieurs techniques : soit découper la gélose en petits fragments ne supportant qu'un seul kyste, ou qu'une seule forme végétative de l'espèce considérée ; soit s'aider d'une pipette Pasteur très effilée, dans laquelle on prélève un petit cylindre de gélose qui dépasse à l'extrémité et sert à prélever l'élément repéré. Cette dernière méthode facilite les manipulations en assurant une meilleure adhérence des kystes ou des trophozoïtes et surtout, le contact avec la gélose s'avère moins traumatisant pour les formes végétatives que celui du verre.

Ces opérations de séparation et de clonage des souches nécessitent l'emploi d'un microscope inversé et des grossissements compris à peu près entre x 100 et x 150. En raison de l'extrême précision demandée, ce procédé, que nous avons utilisé, ne représente pas une règle absolue.

Dans certains cas on peut effectuer la séparation directement

sur la boîte de prélèvement. Au contraire, dans d'autres cas, l'essai échoue partiellement et permet seulement d'augmenter la proportion relative de l'espèce la moins abondante qui est toujours difficile à isoler. On y parvient, en principe, en renouvelant au besoin plusieurs fois ces manipulations.

■ Une autre méthode consiste à utiliser des plaques à cupules pour agglutination. Les kystes ou les formes végétatives à séparer sont récupérés à la surface de la gélose avec de l'eau distillée. La suspension ainsi obtenue est alors soumise à une série de transferts-dilutions par passages successifs à l'aide d'une pipette Pasteur, dans les cupules contenant une goutte d'eau stérile. On parvient finalement à obtenir une goutte d'eau qui ne contient qu'un seul kyste ou une seule forme végétative. L'ensemble de ces opérations doit être réalisé sous contrôle microscopique.

■ Culture des Amibes - Repiquages.

■ Préparation de l'aliment bactérien.

La souche d'entérobactéries dont nous disposons nous a été transmise par le Laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine. Elle est entretenue par repiquages trimestriels sur tube de gélose nutritive (Institut Pasteur-Productions) et conservée à +4°C.

La préparation d'une suspension épaisse d'*Aerobacter aerogenes* nécessite des cultures massives obtenues par inoculation de boîtes de Roux contenant une gélose à 37 ‰ d'extrait coeur-cerveille (B.H.I. DIFCO). Les flacons de Roux ainsiensemencés, sont placés une semaine à 37°C afin d'obtenir un développement suffisant de la culture microbienne. Après ce temps d'incubation, les bactéries sont récupérées avec de l'eau distillée stérile et concentrées par centrifugation. Elles sont ensuite lavées à 3 reprises dans l'eau distillée stérile, par mise en suspension suivie de centrifugation. La suspension finale est conservée à -20°C. Décongelée au moment de l'emploi, elle sera répartie et étalée à la surface des boîtes de gélose.

■ Culture des Amibes.

La culture est réalisée selon Singh (208,214), sur gélose à 1,5 %, pH 7,2, répartie en boîtes de Pétri stériles sur une épaisseur de

2 mm environ. Cette couche de gélose simple est enduite d'une suspension d'*Aerobacter aerogenes*.

L'entretien de chaque souche est alors assuré par des repiquages successifs et réguliers grâce à une öse, ou simplement en découpant à l'aide d'une spatule, un petit morceau de gélose recouvert d'amibes, ou de kystes, que l'on dépose sur une boîte vierge. Les boîtes sont alors scellées au "Parafilm" et placées à l'envers à l'étuve à 28°C.

Le rythme des repiquages est variable selon chaque souche et dépend essentiellement de sa faculté d'enkystement. Pour les amibes qui ne forment pas de kystes, la cadence des repiquages ne peut guère dépasser 10 ou 15 jours. Au-delà de ce laps de temps optimal on risque de voir disparaître la souche qui a consommé tout l'aliment bactérien.

Pour les espèces qui s'enkystent, il n'est pas possible d'énoncer une règle générale. Certaines amibes telles qu'*Acanthamoeba*, ou *Hartmannella*, forment des kystes très résistants (jusqu'à plusieurs années !), alors qu'à l'opposé chez d'autres genres, par suite de l'apparition d'un phénomène de dégénérescence et d'une diminution de la capacité d'enkystement, la viabilité des kystes n'atteint parfois qu'un ou deux mois. Donc, même les souches qui s'enkystent nécessitent une surveillance constante et régulière pour pallier ces éventualités.

■ Réalisation des Microcultures.

■ Nous avons utilisé la méthode d'observation sur le vivant préconisée par Pussard (179,180). Elle nécessite la réalisation de microcultures sur lames.

Pour cela, on coule sur une lame porte-objets (76mm x 26mm x 0,8mm) quelques gouttes de gélose sur lesquelles on dépose avant leur prise en masse, une lamelle couvre-objet de 18mm x 18mm, de façon à obtenir un carré de 1 mm d'épaisseur environ. Après refroidissement total de la gélose on ôte la lamelle, on égalise les bords du carré de gélose, puis on dépose délicatement à la surface de ce carré une très petite goutte de suspension d'entérobactéries contenant des kystes ou des formes végétatives à étudier. On recouvre alors le tout avec une lamelle de dimensions légèrement supérieures à celles du carré de gélose (20mm x 20mm) ; les bords de cette préparation microscopique sont lutés avec de l'huile de paraffine afin d'évi-

ter le dessèchement.

■ Toutefois, lorsqu'il faut étudier des souches qui ne s'enkystent pas, ce procédé ne convient pas toujours : en effet, les trophozoïtes sont quelquefois écrasés au moment de l'application de la lamelle, s'arrondissent et meurent dans les heures qui suivent. Par conséquent, pour observer les formes végétatives, il est préférable d'aménager dans la gélose un petit pertuis central dans lequel est déposée la suspension d'amibes et de bactéries. On évite ainsi l'écrasement des trophozoïtes et, au bout de quelques jours, ceux-ci quittent la cavité et rampent à la surface de la gélose sous la lamelle.

Toutes ces manipulations sont effectuées stérilement, chaque lame et ses deux lamelles étant conditionnées à l'avance dans des boîtes de Pétri et stérilisées avant l'emploi 3 heures à 180°C.

■ Examen microscopique - Microphotographie.

Au cours de notre revue de la littérature nous avons déjà insisté sur les nombreux avantages présentés par la méthode des cultures sur lames. Elle permet dans de bonnes conditions l'examen microscopique en contraste de phase même avec l'objectif à immersion (Grossissement x 100) et aussi l'enregistrement microphotographique des phénomènes observés.

Or les documents photographiques deviennent une nécessité impérieuse dans l'étude des rhizopodes : ils permettent de juger de la qualité des observations rapportées et de compenser en partie les descriptions toujours malaisées de ces cellules continuellement en mouvement. La microphotographie est donc un appoint indéniable à l'identification des espèces.

Elle impose un examen minutieux et laborieux des préparations, à la recherche des cellules les plus favorables à l'obtention d'un cliché de bonne qualité. Pour cela, la plupart des structures cellulaires doivent se trouver dans un même plan. Lorsqu'on travaille en immersion, cette condition est difficile à réaliser.

Toutes les observations présentées dans ce travail ont été obtenues à partir de cultures sur lames étudiées à l'aide d'un microscope équipé en contraste de phase et d'une lampe quartz-iode 100 W (microscope REICHERT-DIAPAN). Pour les examens à l'immersion, les microphotographies ont été prises soit en contraste de phase positif, soit en contraste de

phase "Anoptral". La sensibilité des films est de 125 ASA-22 DIN (ILFORD F P4) et la durée d'exposition d'une, ou une $\frac{1}{2}$ seconde.

■ Test de Flagellation - Obtention de Formes flottantes.

■ Le test de flagellation a pour but de rechercher la capacité éventuelle de certaines amibes, - Naegleria, Tetramitus -, à se transformer en flagellés quand on fait diminuer la pression osmotique du milieu.

Il exige des formes végétatives qui seront prélevées en découpant un petit morceau de gélose sur une culture récente. On introduit ce carré de gélose dans un tube à hémolyse contenant 2 à 2,5 ml d'eau distillée. Le tube est agité, puis placé pendant 4 heures à l'étuve à 25°C. Après ce laps de temps, on recherche l'apparition des formes flagellées ; en cas d'essai négatif on attend 24 heures avant de procéder à un nouvel examen et de conclure à un test négatif.

■ L'obtention de formes flottantes peut se faire de la même manière.

Certaines amibes, lorsqu'elles sont mises en suspension dans l'eau, revêtent une forme particulière, très différente de leur morphologie habituelle sur substrat. Elles présentent alors une masse centrale endoplasmique, ramassée et globuleuse, caractérisée par l'émission de bras ectoplasmiques radiés, très développés. Ces bras, en nombre variable, peuvent être, selon les cas, parfaitement rectilignes ou plus ou moins sinueux.

Nous avons obtenu ces formes flottantes avec plusieurs de nos souches (Cf. Planche I. n° 7-8 p.43) : elles paraissent particulièrement fréquentes chez les amibes de type "flabellulien". Toutefois, il ne semble pas que ces formations soient spécifiques. Page les observe chez plusieurs genres : Vannella, Cochliopodium, Vexillifera, Platyamoeba, Paramoeba, Mayorella, qui se regroupent dans des familles bien différentes (145, 147, 148, 150, 154, 158).

Il faut souligner que l'on ignore encore totalement le déterminisme de ce phénomène.

B. Protocole pour l'Etude quantitative
de la Présence d'Amibes.

■ Le mode de culture sur gélose enrichie de bactéries interdit tout recours à des méthodes de dénombrement direct du type de celles utilisées en bactériologie après ensemencement sur support nutritif solide. En effet, sur un tel milieu, les amibes ne se développent jamais en colonies isolées à la manière des bactéries. La pousse a souvent lieu sous la forme d'une ligne de front continue, au niveau de laquelle les formes végétatives en phase de multiplication active apparaissent très resserrées et absolument impossibles à distinguer les unes des autres.

Même lorsque l'envahissement de la gélose se produit sous forme de cellules dispersées, le nombre même de ces dernières rend illusoire toute tentative de comptage. De plus, certaines amibes passeraient inaperçues, cachées par la membrane de filtration, ou même quelquefois, par l'épaisseur de l'enduit bactérien.

■ La réponse donnée à la présence d'amibes dans un volume d'eau déterminé ne peut donc être que qualitative : présence ou absence d'au moins une amibe dans le volume considéré, selon que l'on constate la positivité ou la négativité de la poussée amibienne sur la boîte ensemencée.

Il est donc nécessaire d'utiliser une méthode de dénombrement indirect par calcul statistique, par analogie avec les méthodes bactériologiques d'ensemencement en milieu de culture liquide où le type de réponse obtenue ne peut être qu'affirmatif ou négatif. Le choix d'un tel protocole apparaît à première vue paradoxal puisque nous travaillons avec un milieu solide, mais se trouve en fait justifié comme nous l'avons indiqué.

■ Nous avons eu recours à un système d'évaluation par méthode statistique du nombre le plus probable (NPP) dont les Tables figurent dans l'ouvrage de Rodier (186).

Parmi les différents protocoles proposés par cet auteur, nous avons retenu le système d'ensemencement n° 4 qui requiert la répartition suivante pour un seul essai quantitatif : 1 fois 50 ml ; 5 fois 10 ml ; 5 fois 1 ml.

Ne pouvant envisager d'ensemencer directement sur les boîtes de Pétri, les deux premières séries de volumes trop importants, nous trai-

Tableau I. Les chiffres indiqués pour N P P correspondent à 100 ml .

Nombre le plus probable & Intervalle de confiance dans le Cas du Système d'Ensemencement N° 4 (Rodier, 1975 (186))					
Nombre de Tubes donnant une réaction positive sur			N. P. P.	Limite de confiance à 95 %	
1 tube de 50 ml	5 tubes de 10 ml	5 tubes de 1 ml		Limite inférieure	Limite supérieure
0	0	1	1	< 0,5	4
0	0	2	2	< 0,5	6
0	1	0	1	< 0,5	4
0	1	1	2	< 0,5	6
0	1	2	3	< 0,5	8
0	2	0	2	< 0,5	6
0	2	1	3	< 0,5	8
0	2	2	4	< 0,5	11
0	3	0	3	< 0,5	8
0	3	1	5	< 0,5	13
0	4	0	5	< 0,5	13
1	0	0	1	< 0,5	4
1	0	1	3	< 0,5	8
1	0	2	4	< 0,5	11
1	0	3	6	< 0,5	13
1	1	0	3	< 0,5	8
1	1	1	5	< 0,5	13
1	1	2	7	1	17
1	1	3	9	2	21
1	2	0	5	< 0,5	13
1	2	1	7	1	17
1	2	2	10	3	23
1	2	3	12	3	28
1	3	0	8	2	19
1	3	1	11	3	26
1	3	2	14	4	34
1	3	3	18	5	53
1	3	4	21	6	66
1	4	0	13	4	31
1	4	1	17	5	47
1	4	2	22	7	69
1	4	3	28	9	85
1	4	4	35	12	101
1	4	5	43	15	117
1	5	0	24	8	75
1	5	1	35	12	101
1	5	2	54	18	138
1	5	3	92	27	217
1	5	4	161	39	> 450

tons ces échantillons par filtration, selon le processus habituel. Les 5 derniers inoculats de 1ml sont ensemencés directement sur les boîtes.

Après ensemencement les boîtes sont scellées au "Parafilm", placées à l'envers dans une étuve à 28°C. Avant de conclure à la positivité ou à la négativité des échantillons, chaque boîte doit être régulièrement examinée pendant 3 ou 4 semaines. Le nombre d'amibes le plus probable au litre, est alors donné en fonction du nombre de boîtes de Pétri positives, en se reportant à la Table de probabilité qui correspond au système d'ensemencement choisi, reproduite Tableau I. p.71.

Nous avons retenu a priori ce système en raison de la bonne précision et de l'étagement suffisants donnés par la Table dans la zone des faibles pollutions.

Enfin, d'un point de vue pratique, nous ferons remarquer qu'un seul prélèvement pour analyse quantitative, représente l'utilisation de 6 filtres différents, l'ensemencement, puis la surveillance de 11 boîtes distinctes. L'obtention d'un seul renseignement quantitatif est donc relativement accaparante.

C. Protocole pour l'Etude de la Pathogénécité des Amibes libres.

L'étude du pouvoir pathogène implique la notion d'inoculats libres de tous contaminants. Dans cet esprit nous avons donc tenté de réaliser des cultures axéniques.

■ Essais de Culture axénique.

■ Nous avons procédé de façon systématique à des tentatives d'axénisation sur les souches de *Naegleria* et d'*Acanthamoeba*.

Nous avons choisi d'utiliser le milieu de Cerva modifié par Willaert (Cf. Annexe I. Milieu CGVS) dont, nous l'avons vu, la formule permet en principe d'axéniser les souches pathogènes de *Naegleria*. Ce milieu peut aussi être utilisé pour la culture axénique d'*Acanthamoeba*.

Stérilisé par filtration sur membrane de nitrate de cellulose (porosité Ø 0,2 microns), le milieu CGVS est ensuite réparti stérilement en tubes vissés (H : 160mm Ø 16mm), à raison de 3ml par tube, puis conser-

vé à +4°C. Les essais d'axénisation sont réalisés en découpant un petit carré de gélose sur une boîte de Pétri riche en trophozoïtes, et en l'introduisant dans un tube de milieu CGVS.

Au cours des premiers repiquages on s'efforce d'éliminer la flore contaminante par l'adjonction de concentrations élevées d'antibiotiques. Nous avons utilisé pour le milieu de départ un mélange de Pénicilline-Streptomycine aux concentrations de 7.000 UI/ml - 300 µg/ml. Les trois premiers repiquages sont en principe assez rapprochés afin d'entretenir la phase de croissance logarithmique. Selon la teneur en amibes, ils auront lieu tous les 3 ou 4 jours. Dès le second passage, il semble possible de diminuer de moitié la concentration des antibiotiques qui sont totalement supprimés lorsque la phase d'adaptation a été surmontée avec succès. Dès lors, le rythme des repiquages peut être ralenti.

Une fois l'axénisation obtenue, il nous a paru inutile d'ajouter des antibiotiques au milieu de culture de façon systématique, comme Willaert le préconise (245).

En entretien de routine le rythme des repiquages pour *Acanthamoeba* se situe entre 7 et 8 jours. Au-delà de ce laps de temps optimal, on risque de perdre la culture axénique à la suite de l'apparition en nombre toujours croissant, d'éléments arrondis correspondant à des kystes plus ou moins normaux, incapables de redonner naissance à des formes végétatives lors de nouveaux repiquages. Ce phénomène de vieillissement se traduit d'ailleurs macroscopiquement par l'apparition, dans le tube de culture, de petits agglomérats visibles à l'oeil nu et indiquant qu'il est temps de réensemencer la souche.

Les repiquages s'effectuent après avoir remis en suspension les amibes par agitation des tubes. Il faut ensuite prélever à la pipette Pasteur un inoculum d'environ 0,5 ml et le transférer dans un milieu neuf. Les cultures axéniques sont incubées à la température de 30°C.

Nous n'avons pas vérifié bactériologiquement la parfaite axénisation de nos cultures. Mais l'absence, a priori évidente, de tout développement bactérien rapidement visible sur ce milieu riche, nous paraît constituer une garantie suffisante, puisque nous avons uniquement utilisé la voie intranasale comme mode d'inoculation.

■ Si l'axénisation s'avère impossible, on peut essayer de culti-

ver les souches à tester en présence d'une suspension d'*Aerobacter aerogenes* tués par chauffage au bain-marie 1 heure à 65°C. Les amibes sont alors récupérées par lavage de la gélose à l'eau distillée et peuvent être administrées par voie intranasale.

■ Inoculation à l'Animal.

■ La souche d'amibes à inoculer est soumise à une série de repiquages rapprochés, - 2 ou 3 -, de manière à obtenir une proportion maximum de formes végétatives. Cerva (40) ayant établi avec *Acanthamoeba culbertsoni* (souche A1) qu'en phase logarithmique de croissance la virulence se trouve exaltée, nous utilisons au terme des sub-repiquages une culture récente de 3 ou 4 jours riche en trophozoïtes.

La suspension amibienne est préparée par centrifugation douce à 1.500 tours / mn pendant une minute. On décante alors la plus grande partie du surnageant par aspiration à la seringue et on remet le culot d'amibes en suspension dans le volume restant. La richesse de la suspension ainsi obtenue peut être précisée en effectuant un dénombrement à la cellule de Thoma, ce qui permet éventuellement de la corriger dans le sens d'une dilution. Cette préparation est entourée de toutes les précautions habituelles de stérilité.

■ Nous avons utilisé, comme la plupart des auteurs, de jeunes souris d'environ 3 semaines pesant entre 15 et 20 g (40,49,63,216).

Nous avons opté pour l'instillation intranasale de préférence à l'inoculation intracérébrale plus traumatisante et moins péremptoire, d'autant que ce procédé choisi reproduit mieux la voie de pénétration suspectée chez l'homme.

Les souris sont anesthésiées à l'éther éthylique. L'anesthésie doit être assez profonde pour éviter un réveil trop rapide de l'animal en cours d'instillation. La souris est alors placée rapidement sur le dos tête en arrière, maintenue avec une main tandis que l'on dépose progressivement au-dessus de ses narines 0,02 ml de la suspension amibienne.

Tableau II. Résultats globaux.

Piscines "d'Eté" à ciel ouvert		Nombre de Prélèvements	Prélèvements positifs	Prélèvements négatifs
Etablissement (Indicatif)				
GERLAND	(GE)	4	4	0
MERMOZ	(ME)	8	6	2
RHONE	(RH)	8	8	0
BRON	(BR)	2	2	0
VENISSIEUX	(VE)	2	2	0
Total		24	22	2
Piscines "d'Hiver" couvertes		Nombre de Prélèvements	Prélèvements positifs	Prélèvements négatifs
Etablissement (Indicatif)				
LUMIERE	(LU)	6	6	0
CHARRIAL	(CH)	4	3	1
VAISE	(VA)	4	2	2
VILLEURBANNE	(VI)	3	3	0
BRON	(BR)	3	3	0
Total		20	17	3
Total général		44	39	5

R é s u l t a t s g l o b a u x .

Notre enquête sur les piscines de l'agglomération lyonnaise est loin d'être achevée. Cependant, les premiers résultats rapportés ici traduisent d'ores et déjà la présence d'amibes libres dans ces eaux pour près de 89 % des prélèvements, en dépit du traitement.

A partir de ces résultats, nous avons essayé d'établir au cours d'une étude qualitative, la fréquence et l'abondance de chaque genre. Enfin nous avons tenté une première approche quantitative du problème.

A. Positivité des Prélèvements.

Nous avons effectué un total de 44 prélèvements dans neuf piscines différentes de l'agglomération lyonnaise. Ces 9 établissements se répartissent de la façon suivante : 4 piscines couvertes ou "d'hiver" , 3 piscines à ciel ouvert ou "d'été" , 2 piscines fonctionnant tout au long de l'année dont l'une, Vénissieux, n'a été contrôlée qu'en été.

Sur ces 44 échantillons d'eaux de bassins, 39 se sont avérés positifs quant à la présence d'amibes soit 88,6 %.

Le Tableau II. , page 75, montre la répartition de ces prélèvements suivant qu'il s'agit de piscines fermées ou à ciel ouvert, en remarquant que l'une d'entre elles, Bron, qui fonctionne sur les deux modes, a été examinée à deux saisons différentes. Ce Tableau permet de constater que des prélèvements dans tous les établissements se sont, en définitive, révélés positifs.

Ces résultats prouvent la présence quasi constante d'amibes "libres" dans les eaux des piscines, ainsi que l'inefficacité des mesures actuelles de nettoyage et de chloration pour empêcher leur développement. Ils corroborent pleinement ceux publiés par Jadin & Coll.: Desmet-Paix et Fisch-Thiébaud (74), réalisant 95 prélèvements dans 20 piscines, isolent des amibes dans 80 % des cas.

B. Dénombrement et Recensement des Souches.

Les Tableaux III. et IV. pages 78 et 79, recensent pour les bassins "d'hiver" et "d'été", le nombre de souches d'espèces différentes

isolées dans chacun des prélèvements : au total, pour l'ensemble des 44 échantillons, nous avons recueilli 85 souches d'amibes.

■ La comparaison des deux types de bassins montre une plus grande diversité des souches d'amibes dans les piscines "d'été".

En effet, on isole en moyenne

■ $27 / 20 = 1,3$ souches d'amibes par prélèvement d'un litre dans les piscines couvertes "d'hiver"

■ contre $58 / 24 = 2,4$ souches par prélèvement d'un litre en piscines "d'été".

La comparaison par le Test de t de ces deux valeurs donne pour t la valeur de 2,89 qui, avec d.d.l. = 42, correspond à une différence significative au risque 1% entre les deux moyennes des piscines "d'hiver" et piscines "d'été".

On peut penser que cette différence dans le nombre moyen de souches isolées traduit une plus grande richesse en amibes des eaux de piscines "d'été". Celle-ci résulterait d'une pollution plus importante en cette saison. Elle dépend probablement de plusieurs facteurs jouant dans le même sens : fréquentation plus importante des bassins "d'été" ; contamination par les poussières atmosphériques susceptibles de véhiculer des kystes amibiens sur ces bassins à ciel ouvert ; enfin chloration plus difficile à assurer du fait de l'évaporation plus importante l'été. Le Tableau IV., p.79 met bien en évidence cette diversité puisque 8 prélèvements réalisés dans des bassins à ciel ouvert renferment 3 ou 4 souches différentes d'amibes et qu'en outre, 2 prélèvements contiennent respectivement 5 et 6 souches.

C. Dénomination provisoire des Souches isolées.

Devant la multiplicité des souches isolées, il nous est apparu nécessaire d'adopter un système de classement pratique et rationnel. Pour ce faire, nous avons désigné chaque souche par :

Tableau III. Nombre de souches isolées en fonction des prélèvements.

Piscines d'Hiver Etablissement (Indicatif)	Numéro des Prélèvements	Nombre de souches isolées
LUMIERE (LU)	1 (11.03.74)	3
	2 (11.03.74)	2
	3 (27.03.74)	2
	4 (27.03.74)	1
	5 (8.04.74)	3
	6 (8.04.74)	2
T o t a l	6 =	13
CHARRIAL (CH)	1 (19.03.74)	0
	2 (19.03.74)	1
	3 (19.03.74)	1
	4 (17.04.74)	1
T o t a l	4	3
VAISE (VA)	1 (20.03.74)	0
	2 (20.03.74)	0
	3 (2.04.74)	1
	4 (2.04.74)	1
T o t a l	4	2
VILLEURBANNE (vi)	1 (25.03.74)	1
	2 (25.03.74)	1
	3 (28.03.74)	1
T o t a l	3	3
BRON (BR)	1 (10.04.74)	3
	2 (10.04.74)	2
	3 (17.04.74)	1
T o t a l	3	6
T o t a l g é n é r a l	20 prélèvements	27 souches

Tableau IV. Nombre de souches isolées en fonction des prélèvements.

Piscines d'Eté Etablissement (Indicatif)	Numéro des Prélèvements	Nombre de souches isolées
GERLAND (GE)	1 (21.06.74)	3
	2 (21.06.74)	2
	3 (30.07.75)	1
	4 (30.07.75)	2
	Total	8
MERMOZ (ME)	1 (19.06.74)	1
	2 (19.06.74)	2
	3 (19.06.74)	1
	4 (26.06.74)	1
	5 (26.06.74)	0
	6 (26.06.74)	0
	7 (29.07.75)	3
	8 (29.07.75)	2
	Total	10
RHONE (RH)	3 (20.06.74)	4
	4 (20.06.74)	3
	5 (13.08.74)	6
	6 (13.08.74)	2
	7 (29.07.75)	2
	8 (29.07.75)	5
	9 (30.07.75)	3
	10 (30.07.75)	2
	Total	27
BRON (BR)	4 (31.07.75)	4
	5 (31.07.75)	2
	Total	6
VENISSIEUX (VE)	1 (30.07.75)	3
	2 (30.07.75)	4
	Total	7
Total général	24 prélèvements	58 souches

Tableau V. Distribution des souches en fonction des genres
et des prélèvements positifs.

Genres	Acanthamoeba polyphaga		Acanthamoeba castellanii		Hartmannella		Saccamoeba		Vahlkampfia		Naegleria		Amibes flagellantes		Fulamoeba		Nuclearia		Diverses	
	= 14.		= 7.		= 21.		= 5.		= 5.		= 1.		= 19.		= 3.		= 2.		= 8.	
LU ₁	LU ₁ a		LU ₂ a		LU ₁ b														LU ₁ d	
LU ₂					LU ₂ b															
LU ₃	LU ₃ b		LU ₃ a																	
LU ₄							LU ₄ a													
LU ₅	LU ₅ b		LU ₅ a																LU ₅ c	
LU ₆	LU ₆ b		LU ₆ a																	
CH ₂																			CH ₂ a	
CH ₃													CH ₃ a							
CH ₄					CH ₄ a															
VA ₃					VA ₃ a															
VA ₄																			VA ₄ a	
VI ₁															VI ₁ a					
VI ₂																			VI ₂ a	
VI ₃	VI ₃ a																			
BR ₁	BR ₁ c	BR ₁ a													BR ₁ b					
BR ₂	BR ₂ b				BR ₂ a															
BR ₃							BR ₃ a													
GE ₁									GE ₁ a, GE ₁ b								GE ₁ c			
GE ₂					GE ₂ b								GE ₂ a							
GE ₃	GE ₃ a																			
GE ₄					GE ₄ a								GE ₄ b							
ME ₁					ME ₁ a															
ME ₂	ME ₂ b																		ME ₂ a	
ME ₃													ME ₃ a							
ME ₄													ME ₄ a							
ME ₇					ME ₇ c								ME ₇ a						ME ₇ b	
ME ₈	ME ₈ a				ME ₈ b															
RH ₃	RH ₃ c				RH ₃ d			RH ₃ a					RH ₃ b							
RH ₄	RH ₄ a	RH ₄ c			RH ₄ b															
RH ₅					RH ₅ e	RH ₅ c	RH ₅ b, RH ₅ f						RH ₅ a, RH ₅ d							
RH ₆	RH ₆ b									RH ₆ a										
RH ₇					RH ₇ b								RH ₇ a							
RH ₈	RH ₈ d	RH ₈ c			RH ₈ e								RH ₈ a						RH ₈ b	
RH ₉					RH ₉ a, RH ₉ c								RH ₉ b							
RH ₁₀					RH ₁₀ b								RH ₁₀ a							
BR ₄							BR ₄ b, BR ₄ c						BR ₄ a	BR ₄ d						
BR ₅					BR ₅ a								BR ₅ b							
VE ₁					VE ₁ b								VE ₁ a, VE ₁ c							
VE ₂					VE ₂ c								VE ₂ b, VE ₂ d				VE ₂ a			

- deux lettres majuscules, correspondant aux deux premières lettres du nom de la piscine ("Indicatif" Tableaux III et IV, pp.78-79),
- suivies d'un chiffre arabe en indice, correspondant au numéro d'ordre de chacun des prélèvements effectués dans une même piscine (pp.78 & 79)
- enfin, une lettre minuscule désignant la, ou celle des souches isolées dans le cas où le même échantillon a permis d'isoler plusieurs sortes d'amibes.

Cette nomenclature nous fait retrouver à coup sûr l'origine de la souche, la date de son isolement et l'endroit de la piscine où s'est effectué le prélèvement.

D. Fréquence et Abondance des Souches pour chaque Genre.

Le tableau de contingence ci-contre (Tableau V.) recense le nombre de souches isolées pour chaque genre d'amibes, ou pour un type morphologique donné lorsque la détermination du genre s'avère délicate, pour chaque prélèvement.

Malgré son imprécision à l'égard de certains types d'amibes difficiles à déterminer, ce tableau permet néanmoins de retirer quelques renseignements sur le "peuplement amibien" des piscines.

Nous essaierons de préciser ce peuplement à l'aide de deux indices, l'abondance relative et la fréquence d'un genre ou d'un type morphologique, respectivement définis par

- le rapport $\left[\frac{\text{Nombre de Souches correspondant au Genre}}{\text{Nombre Total de Souches isolées}} = \textcircled{A.} \right]$
- et le rapport $\left[\frac{\text{Nombre de Prélèvements où le Genre est présent}}{\text{Nombre Total de Prélèvements}} = \textcircled{F.} \right]$

L'application de ces deux indices au Tableau V. permet d'arriver aux résultats consignés Tableau VI. page 82.

Tableau VI. Fréquence et abondance des principaux Genres.

	GENRE	FREQUENCE	ABONDANCE
		(% DES PRELEVEMENTS)	(% DES SOUCHES)
AMIBES DE TYPE "LIMAX" 37,7 % DES SOUCHES	<u>HARTMANNELLA</u>	$20/44 = (45,4 \%)$	$21/85 = (24,7 \%)$
	<u>SACCAMOEBEA</u>	$4/44 = (9,1 \%)$	$5/85 = (5,9 \%)$
	<u>VAHLKAMPFIA</u>	$3/44 = (6,8 \%)$	$5/85 = (5,9 \%)$
	<u>NAEGLERIA</u>	$1/44 = (2,3 \%)$	$1/85 = (1,2 \%)$
	<u>ACANTHAMOEBA</u>	$15/44 = (34,1 \%)$	$21/85 = (24,7 \%)$
AMIBES DE TYPE "FLABELLULIEN"	PLUSIEURS GENRES	$16/44 = (36,4 \%)$	$19/85 = (22,4 \%)$
AMIBES DE TYPE "FILOSA"	PLUSIEURS GENRES	$5/44 = (11,4 \%)$	$5/85 = (5,9 \%)$

■ En prenant uniquement les genres en considération, on constate que les souches d'amibes appartenant aux genres Hartmannella et Acanthamoeba sont à la fois les plus fréquentes et les plus abondantes. La prédominance de ces deux genres est confirmée par les travaux de Cerva (48,52). Selon cet auteur les amibes du genre Hartmannella arrivent largement en tête : 34 sur les 74 souches isolées dans la piscine d'Usti, soit 45,9 %, et 13 sur les 33 souches isolées dans les différentes piscines de Stockholm, soit 39,4 %. Le genre Acanthamoeba arrive en deuxième position dans la piscine d'Usti avec, toutefois, un pourcentage inférieur à celui que nous avons trouvé : 11 souches d'Acanthamoeba sur 74 : 14,8 %, au lieu de 24,7 % dans notre étude.

■ Nos résultats concordent également avec ceux de Cerva quant à la rareté relative du genre Naegleria : parmi les 85 souches isolées à Lyon, nous n'avons identifié Naegleria qu'une seule fois. De même, Cerva (48) ne trouve que 3 souches appartenant à ce genre sur les 74 isolées à la piscine d'Usti, et 1 souche sur les 33 isolées dans les piscines de

Stockholm. La même constatation se retrouve dans les enquêtes de Desmet-Paix et Fisch-Thiébaud (74) en Belgique : sur 95 prélèvements réalisés dans 20 piscines différentes, ils n'ont pu isoler une seule souche de *Naegleria*.

Par contre, à côté de ces échantillons d'eaux provenant directement des bassins, nous avons pu à trois reprises, pratiquer des prélèvements au-dessus des filtres à sable des piscines : 2 d'entre eux ont permis d'isoler des souches de *Naegleria*.

Faut-il en conclure que les amibes du genre *Naegleria* se rencontrent préférentiellement au niveau des filtres plutôt que dans l'eau des bassins ?

Cette éventualité peut se concevoir si l'on se réfère aux travaux de Derreumaux & Coll. (73) qui ont montré que *Naegleria* était plus sensible au chlore qu'*Acanthamoeba*. Si l'on est en droit d'admettre un taux de chlore efficace dans l'eau des bassins, il est par contre probable que celui-ci est très réduit, voire même nul, au-dessus des filtres à sable en fin de circuit : ainsi s'expliqueraient à la fois la rareté du genre *Naegleria* dans l'eau des bassins et son développement préférentiel au niveau des filtres.

■ L'absence de systématique complète et définitive des amibes ne permet pas une identification précise de toutes les souches isolées au cours de cette enquête. Si on considère uniquement les grands types morphologiques rencontrés, ce qui correspond à une analyse plus approximative, on se rend compte que les amibes de type "limax" ne sont pas les seules isolées dans les piscines. Il est au contraire frappant de constater l'étonnante diversité de genres et d'espèces auxquels notre analyse est confrontée (Cf. Tableaux V. et VI. pp.80,82). A notre connaissance peu d'auteurs, jusqu'à présent, ont été amenés à de tels résultats, peut-être parce que peu nombreux sont ceux qui ont tenté une approche qualitative du problème.

► Le terme d'amibes "limax", qui évoque de façon très schématique et sommaire l'attitude prise par certaines amibes durant leur locomotion, vient d'être redéfini de manière plus précise par Page (156). D'après cet auteur il faut employer cette expression comme un terme descriptif général pour des amibes qui, en déplacement, apparaissent cylin-

driques, ou sub-cylindriques, monopodiales, et chez lesquelles la zone ectoplasmique antérieure n'est pas plus aplatie que la masse endoplasmique. Toujours d'après Page, parmi les souches que nous avons isolées et identifiées il faut regrouper sous ce terme "limax", les genres *Hartmannella* et *Saccamoeba* (Hartmannellidae) d'une part, et *Vahlkampfia* et *Naegleria* (Vahlkampfiidae) d'autre part.

Dans ces conditions les amibes de type "limax" prédominent effectivement (Cf. Tableau VI. p.82) : les 4 genres précités regroupent 32 souches sur 85, soit 37,7 % des souches, et apparaissent dans 25 prélèvements sur 44.

► Mais on peut opposer à ce type "limax" fréquent, un autre type morphologique de conception aussi générale que lui, qui renferme, comme lui, des genres et même des familles très disparates chez lesquels on observe cependant des points communs. Nous les appellerons amibes de type "flabellulien". Cet aspect rassemble des souches qui s'étalent en principe largement sur le substrat et qui présentent une délimitation très nette entre ectoplasme et endoplasme. Lors des déplacements, qui s'effectuent sans émission de pseudopodes individualisés, l'ectoplasme forme une lame d'allure souvent flabelliforme déployée à l'avant de la cellule, tandis que l'endoplasme granuleux, et plus épais, se trouve rejeté en arrière. Les souches qui correspondent à ce type morphologique ont en outre la particularité de présenter pour la plupart, des formes flottantes radiées.

Le type "flabellulien" correspond à plusieurs genres de délimitation incertaine et malaisée qui sont classés par Page (161) dans les familles des Thecamoebidae : *Thecamoeba*, *Sappinia*, *Platyamoeba*, *Pessonnella*, *Vannella* ; des Flabellulidae : *Flabellula*, *Rosculus* ; des Hyalodiscidae : *Hyalodiscus*, *Flamella*.

D'après nos résultats ce groupe occupe une position non négligeable puisqu'il rassemble 19 souches sur 85, soit 22,4 % des souches, et qu'on le retrouve dans 16 des 44 prélèvements (Cf. Tableau VI. p.82).

► Enfin, nous avons pu isoler un troisième groupe très différent des précédents : il s'agit d'amibes de type "filosa", très caractéristiques en raison de leurs pseudopodes filamenteux, présentes à raison de 5 souches sur 85 (Cf. Tableau VI. p.82).

E. Approche quantitative.

Peu d'enquêtes systématiques ont été entreprises pour déterminer l'aspect quantitatif de la présence d'amibes dans les eaux. Cette absence de résultats tient peut-être au côté contraignant de ce type d'analyses. Le plus souvent les auteurs signalent simplement la présence d'amibes dans l'eau analysée, mais sans précision numérique. Ainsi, Jadin (106,111) retrouve des amibes dans 15 réseaux d'alimentation en Belgique et dans ceux de 26 grandes villes du monde entier.

■ La plupart des chiffres dont nous disposons résultent d'essais de sondage dispersés, qui restent généralement isolés et ne s'inscrivent pas dans le cadre d'une prospection générale et méthodique. Jadin (105) a retrouvé, à quatre reprises, de 800 à 1.000 amibes par litre dans l'eau du réseau anversoïse : cette contamination se constate même à la sortie des stations d'épuration.

Pour les piscines, les résultats sont aussi clairsemés. Les premières tentatives de dénombrement ont été effectuées par Cerva (48) qui rapporte, pour la piscine d'Usti, un chiffre d'amibes compris le plus souvent entre 100 et 1.000 amibes par litre et atteignant même, à une occasion, 10.000 amibes au litre. Les plus fortes pollutions se rencontrent aux endroits les plus profonds ou encore, dans les zones mortes de la piscine.

Selon Hermanne & Coll. (96) le chiffre de 1.000 amibes au litre représente pour un bassin, un indice de pollution importante qui devrait entraîner sa fermeture.

Plus récemment, à Stockholm, Cerva et Huldt (52) ont pu noter les chiffres suivants dans cinq piscines différentes de la ville : 10, 10, 700, 120, 100, amibes par litre prélevé.

Enfin, à Anvers, Desmet-Paix et Thiébaud (74), effectuant à plusieurs mois d'intervalle trois essais quantitatifs dans le même bassin et au même point, obtiennent les teneurs suivantes en amibes par litre : 30, 25, 9.

Tableau VII. Nombre le plus probable et Intervalle de confiance
dans le cas du système d'ensemencement n° 4 (Rodier, 1975(186))

Piscines d'Hiver	Nombre de boîtes donnant une réaction positive sur :			Amibes au litre N . P . P .	Limites de confiance à 95 %	
	Premiers prélèvements	1 boîte de 50 ml	5 boîtes de 10 ml	5 boîtes de 1 ml	inf.	sup.
	VE	0	2	0	20	< 5 60
	BR	0	0	0	< 10	
	IN	1	1	0	30	< 5 80
	GA	0	0	0	< 10	
	LU	0	0	0	< 10	
Seconds prélèvements						
	VE'	1	3	1	110	30 260
	BR'	0	1	0	10	< 5 40
	IN'	0	0	0	< 10	
	GA'	0	0	0	< 10	
	LU'	0	0	0	< 10	
Piscines d'Eté						
	RH	1	2	1	70	10 170
	VE	1	1	1	50	< 5 130
	BR	0	1	0	10	< 5 40
	ME	0	0	0	< 10	

■ Puisque le nombre de souches isolées semble indiquer une présence d'amibes plus importante dans les piscines d'été que dans les piscines d'hiver, nous avons entrepris des essais quantitatifs sur ces deux types de bassin pour les comparer, avec l'espoir de traduire la différence éventuelle par des données numériques.

Nous avons d'une part, pratiqué 10 prélèvements dans cinq piscines couvertes, à raison de 2 prélèvements par piscine effectués à plusieurs jours d'intervalle (piscines de Vénissieux, VE, Bron, BR, INSA, IN, Lumière, LU, et piscine municipale de Lyon, GA : Tableau VII. ci-contre).

D'autre part, nous avons commencé au cours de l'été 1976 une série de prélèvements en piscines à ciel ouvert. En fait nous n'avons pu en réaliser que 4 (Rhône, RH, Vénissieux, VE, Bron, BR, Mermoz, ME : Tableau VII. ci-contre).

Les résultats consignés dans le Tableau VII. montrent que le nombre de prélèvements effectués dans les piscines d'été n'est pas suffisant pour que l'on puisse tirer de la comparaison avec les chiffres obtenus dans les piscines d'hiver, une conclusion définitive.

■ Néanmoins, ces premières données semblent confirmer l'impression qui se dégageait lors du dénombrement des souches, à savoir que la pollution amibienne est plus importante en été. En effet, sauf dans un cas où le nombre le plus probable d'amibes est de 110 au litre, dans les piscines d'hiver il se situe le plus souvent au-dessous de 10 amibes par litre. Par contre, toutes réserves étant faites sur le petit nombre d'échantillons analysés, le NPP dans les piscines d'été paraît plus élevé puisque dans 2 des 4 prélèvements, nous avons dénombré 50 et 70 amibes par litre.

■ Quoi qu'il en soit, tous nos prélèvements se situent nettement au-dessous du seuil de 1.000 amibes au litre considéré par Hermanne comme un signe d'alarme (96), mais pourquoi ce chiffre ne serait-il pas de 100 amibes au litre ? Il y aurait donc lieu, apparemment, de se montrer a priori satisfait et de croire à l'efficacité du traitement des eaux tel qu'il est effectué. A la vue de ces quelques essais quantitatifs on pourrait se demander si l'on n'a pas dramatisé la question.

En fait, nous pensons qu'il vaut mieux rester circonspect plutôt que d'afficher un optimisme de circonstance car bien des exemples

prouvent qu'actuellement, dans le domaine des amibes libres il vaut mieux se garder des idées préconçues. Les faits déconcertants constituent en effet le lot commun.

Ainsi, *Naegleria fowleri*, souche pathogène, n'a jamais pu être isolée d'aucune eau de piscine malgré les efforts de Jadin en Belgique : 5 cas mortels ; et ceux de Cerva en Tchécoslovaquie : 16 cas mortels dans la piscine d'Usti (42,43).

Desmet-Paix et Fisch-Thiébaud, en 1975, travaillant en piscine couverte, n'ont pu établir de corrélation positive entre la présence d'amibes d'une part et, d'autre part : le taux de chlore actif - tout au moins pour des variations comprises entre 0,2 et 0,8 mg / l - ; le taux de pollution bactérienne comme on pouvait logiquement s'y attendre. (Cerva (48) avait déjà rapporté cette absence de corrélation) ; et enfin, la fréquentation du bassin (74).

En outre, les résultats que nous avons obtenus en procédant à l'inoculation à la Souris des souches d'*Acanthamoeba* isolées des bassins suffisent pour convaincre de la réalité du problème (Cf. Tableau IX. p.96).

■ En conclusion, les premiers résultats quantitatifs de cette enquête montrent que les 9 piscines examinées contiennent toutes des amibes libres car le nombre de prélèvements négatifs est très faible (5 / 44) et le nombre de souches isolées très important : 85 pour 44 prélèvements ; la pollution amibienne semblant plus importante dans les piscines d'été que dans celles d'hiver.

Qualitativement le genre *Hartmannella* est retrouvé dans 45 % des échantillons et représente 24,7 % des souches isolées, suivi de près par le genre *Acanthamoeba*. Par contre, le genre *Naegleria* n'a été isolé qu'une seule fois en pleine eau mais, à deux reprises au-dessus des filtres à sable.

Etude du Pouvoir pathogène de quelques souches d'Acanthamoeba isolées de Piscines.

Nous rappelons qu'à la suite des travaux expérimentaux de Culbertson (62,63,64,66) et à la lumière d'observations cliniques récentes (15,30,115), on est amené à suspecter le pouvoir pathogène éventuel de certaines souches d'Acanthamoeba même si la pathologie rapportée à ces amibes apparaît, pour l'instant, plus limitée que celle due à Naegleria.

Devant le nombre important de souches d'Acanthamoeba isolées des piscines, - 25% du nombre total de souches -, nous avons essayé de tester systématiquement la virulence des amibes appartenant à ce genre. Avant d'examiner les résultats ainsi obtenus, nous énumérerons les espèces actuellement connues afin d'y rapporter nos souches.

A. Les Espèces du Genre Acanthamoeba.

Nous ne redonnerons pas ici une longue description des différentes espèces du genre Acanthamoeba, sans nul doute un des mieux connus actuellement (138,144,172,173,175,177,193,195,241). Nous rappellerons simplement l'existence des nombreuses espèces maintenant individualisées au sein de ce genre.

L'identification de certaines d'entre elles peut s'effectuer à partir des caractères dimensionnels et morphologiques présentés par les kystes et ce, malgré l'extrême variabilité généralement observée. L'individualisation morphologique, pour d'autres espèces, s'avère par contre excessivement délicate, mais elle a reçu, au cours de ces dernières années, le bénéfice des méthodes immunologiques (2,240,250).

Il semble qu'à la lumière des données morphologiques et antigéniques, on puisse faire les regroupements suivants.

■ Groupe I.

Acanthamoeba à petits kystes, toujours inférieurs à 20 μ m,

dont l'enveloppe interne est anguleuse, voire même étoilée.

On peut inclure dans ce groupe, les espèces :

► *A. castellanii* Douglas 1930 - synonyme d'*A. terricola* Pussard 1964 -

Kyste à double paroi (Cf Planche II. n°9 - n°11, p.93) à membrane externe plissée, irrégulière, appliquée de manière plus ou moins lâche contre l'enveloppe interne. Celle-ci apparaît étoilée à 6, 7, ou 8 branches nettement tronquées. Si ce nombre de branches descend au-dessous de 5, l'aspect devient polyédrique. Ostioles de sortie placés au fond d'une petite dépression. Dimensions des kystes : 12 à 21 μm , 17 μm en moyenne (144).

► *A. rhysodes* Singh 1952.

Difficile à différencier morphologiquement de la précédente. Singh et Das distinguent cette espèce par sa petite taille.

► *A. polyphaga* Puschkarew 1913.

Planche II., n°12 & n°13, p. 93. Paroi kystique externe plissée, plus ou moins appliquée à la paroi interne généralement polyédrique, rarement de forme étoilée, ou alors ne dépassant pas 5 branches. Dimensions du kyste plus faibles que chez *A. castellanii* : 13 μm d'après Page (144).

Au niveau de ce groupe les différences morphologiques sont en principe suffisamment tranchées pour permettre la distinction entre *A. castellanii* et *A. polyphaga* et ceci malgré l'extrême variabilité des caractères kystiques.

Des différences antigéniques ont pu être relevées entre ces espèces (2,240,250) qui demeurent, cependant, étroitement apparentées.

■ Groupe II.

Ce deuxième groupe rassemble plusieurs espèces d'*Acanthamoeba* pour lesquelles on peut établir des constatations pratiquement opposées à celles qui viennent d'être énoncées. En effet, ces espèces se différencient nettement car elles ne possèdent pas de communauté antigénique entre elles, ni avec les espèces du groupe précédent. Par contre, leur distinction d'un point de vue morphologique s'avère excessivement difficile, voire même impossible.

Ce sont des amibes à petits kystes arrondis, toujours infé-

rieurs à 20 microns. Cette tendance plus ou moins marquée du kyste à prendre une forme circulaire s'accompagne également d'un accolement beaucoup plus prononcé des deux membranes externe et interne qui deviennent même, à la limite, impossibles à distinguer sur le vivant.

On peut inclure dans ce Groupe II, les espèces suivantes :

► *A. culbertsoni* Singh 1970.

C'est la souche princeps A1 isolée par Culbertson aux USA en 1958.

Un exemplaire de cette souche nous a été aimablement remis par le Docteur Molet de l'Institut de Parasitologie de Strasbourg.

► *A. palestiniensis* Reich 1933.

► *A. lenticulata* Molet 1976.

► Souche GE_{3a} ou *A. pustulosa* Pernin, Pussard et Pons 1976.

Cette souche forme des kystes d'aspect géométrique régulier, le plus souvent hexa, hepta, ou octogonaux (Cf Planche II. n°14 à 17 p. 93. L'existence de la deuxième membrane, ou membrane externe, se devine à peine sur le vivant.

Il s'agit indiscutablement d'une nouvelle espèce d'*Acanthamoeba*, qui fera l'objet d'une publication ultérieure.

■ Groupe III.

Ce dernier groupe s'individualise nettement, à la fois par ses caractères antigéniques et morphologiques.

Ce sont des *Acanthamoeba* à grands kystes étoilés, réparties en deux espèces distinctes :

► *A. astronyxis* Ray et Hayes 1954.

Les kystes, très caractéristiques, atteignent de plus grandes dimensions que ceux des espèces des groupes I. et II. : en moyenne 20 μ m selon Page (144), 19,2 μ m pour Sawyer et Griffin (193), 21,3 μ m pour Pussard (177). La paroi externe apparaît circulaire, elle est moins plissée que chez *A. castellanii* ou chez *A. polyphaga*. La paroi interne est typiquement étoilée : en moyenne 7,3 branches selon Pussard. Les branches de l'étoile ne sont pas tronquées, comme chez *A. castellanii* ou *A. polyphaga*. Enfin : les ostioles de sortie ne sont pas placés au fond d'une

Planche II.

Photographies n° 9 à n° 17 : Microphotographies prises sur le vivant
en contraste de phase "Anoptral".

Grossissement : x 1.500 .

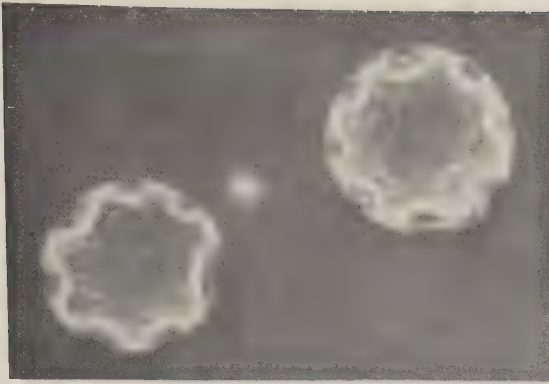
- Photographies n°9 à n°11 : Kystes d'*Acanthamoeba castellanii* souche B R₁ a
Remarquer l'existence des deux enveloppes.

- Photographies n°12 & n°13 : Kystes d'*Acanthamoeba polyphaga* souche R H₃ c
Les ostioles se situent aux points de rencontre des deux membranes.
Remarquer l'aspect moins étoilé que chez *A. castellanii*.

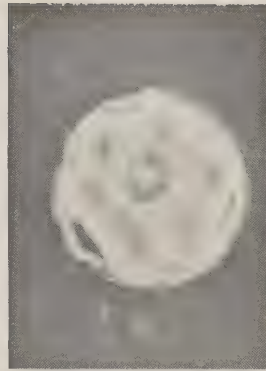
- Photographies n°14 à n°17 : Kystes d'*Acanthamoeba pustulosa* souche G E₃ a
Remarquer la forme plus régulière du kyste et l'accolement étroit des
deux membranes, la membrane externe se devinant à peine.

Légendes en regard des Flèches :

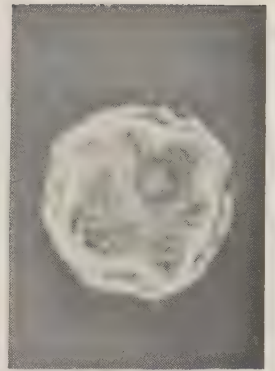
m.e = membrane externe.



9



10



11



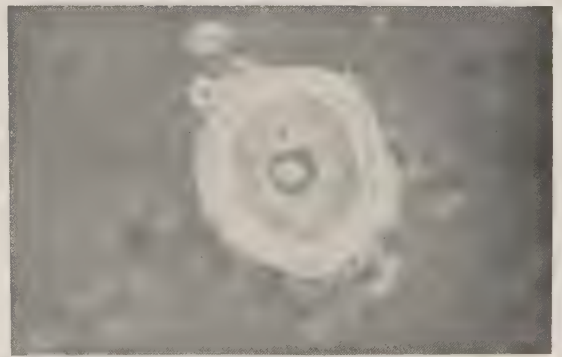
12



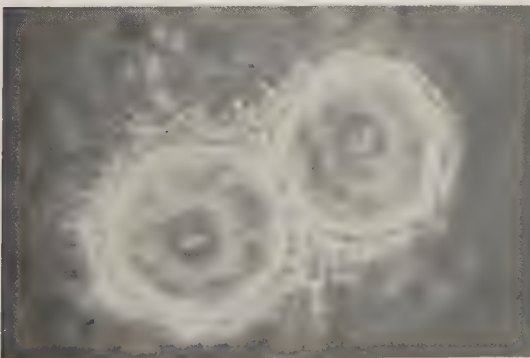
13



14



15



16



17

dépression externe, comme chez *A. castellanii* ou *A. polyphaga*.

► *A. comandoni* Pussard 1964.

Cette espèce a été définitivement séparée de la précédente par Pussard (177) grâce à certaines différences relevées au cours de l'évolution mitotique.



Partant de ces connaissances morphologiques, nous avons, à partir de l'observation par microscopie en contraste de phase, réparti comme suit les 21 souches d'*Acanthamoeba* que nous avons isolées (Cf. Tableau V. p.80) :

- 13 souches d'*Acanthamoeba polyphaga*
- 7 souches d'*Acanthamoeba castellanii*
- 1 souche GE_3a qui ne se rattache à aucun des aspects déjà décrits et représente donc une nouvelle espèce.

La présence simultanée et fréquente des deux espèces *A. polyphaga* et *A. castellanii* dans plusieurs prélèvements nous a paru remarquable. Le Tableau VIII. expose cette fréquence de l'association des souches d'*A. polyphaga* et *A. castellanii* dans les piscines lyonnaises :

		Acanthamoeba polyphaga	
		(+)	(-)
A. castellanii	(+)	6	1
	(-)	8	24

Le test du χ^2 après correction de Yates en raison des faibles effectifs, montre que la liaison entre ces deux espèces est hautement significative : $\chi^2_{\text{corrigé}} = 6,7$. L'association observée entre ces deux espèces est donc plus fréquente que ne le voudrait une simple répartition au hasard.

Tableau IX. Résultats des tests de Pathogénicité des souches d'*Acanthamoeba* isolées.

Souche	E s p è c e	Axénisation	Nombre moyen approximatif d'Amibes instillées	Nombre de S O U R I S inoculées	D E C E S (durée de survie (en jours.)	S U R V I E (S .)
RH₃c	A. polyphaga	+	35.000 26.000	6 4	6,6,7,8,9, 5,5,5,6	S. -
RH₄a	A. polyphaga	-				
RH₄c	A. castellanii	-				
RH₆b	A. polyphaga	+	60.000 35.000	4 6	- -	S.S.S.S. S.S.S.S.S.S.
RH₈c	A. castellanii	-				
RH₈d	A. polyphaga	+	60.000 30.000	4 5	6,6,6 -	S. S.S.S.S.S.
ME₂b	A. polyphaga	+	45.000 26.000 25.000	4 6 5	4,4,5, 5 7 7,7,7,11	- S.S.S.S.S. S.
ME₈a	A. polyphaga	+	75.000	8	-	S.S.S.S.S.S.S.S.
LU₁a	A. polyphaga	+	35.000 35.000	3 5	- -	S.S.S. S.S.S.S.S.
LU₂a	A. castellanii	+	60.000	6	5,7,7	S.S.S.
			40.000	7	5,6,6,6,6	S.S.
			21.000	5	7,7	S.S.S.
			21.000	7	5	S.S.S.S.S.S.
			16.000	6	-	S.S.S.S.S.S.
LU₃a	A. castellanii	+	67.000	4	4,5,5,6	-
			32.000	9	4,6,7,7,7,7,11	S.S.
			8.600	9	-	S.S.S.S.S.S.S.S.S.S.
			1.600	7	-	S.S.S.S.S.S.S.S.
LU₃a	A. castellanii	+	55.000 15.000	6 6	4,4,5,5 -	S.S. S.S.S.S.S.S.
LU₃b	A. polyphaga	+	non testée			
LU₅a	A. castellanii	+	45.000 35.000 6.500	3 5 6	4,4,6 5,9 -	- S.S.S. S.S.S.S.S.S.
LU₅b	A. polyphaga	-				
LU₆a	A. castellanii	A faire				
LU₆b	A. polyphaga	-				
GE₃a	A. pustulosa	+	23.000	10	-	S.S.S.S.S.S.S.S.S.S.
			18.000	6	-	S.S.S.S.S.S.
			6.000	8	-	S.S.S.S.S.S.S.S.
			5.000	5	-	S.S.S.S.S.
BR₁a	A. castellanii	+	50.000	5	-	S.S.S.S.S.
BR₁c	A. polyphaga	+	non testée			
BR₂b	A. polyphaga	+	40.000	5	4,6	S.S.S.
			27.000	8	-	S.S.S.S.S.S.S.S.
			24.000	6	5,7,7,9	S.S.
VI₃	A. polyphaga	+	43.000	6	5,6,6	S.S.S.
			27.000	8	7	S.S.S.S.S.S.
A 1 (du Docteur Molet, (Institut de Parasitologie (de Strasbourg)	A. culbertsoni	+	17.000	5	non notés	-
			8.000	4	non notés	-
			5.500	5	non notés	-
			1.700	5	non notés	-

B. Etude du Pouvoir pathogène des Souches isolées.

■ Conditions expérimentales et Résultats obtenus.

■ A ce jour, nous avons tenté d'axéniser 20 souches différentes sur milieu de Cerva modifié (245). Cette opération a été couronnée de succès pour 15 d'entre elles (Cf. Tableau IX. p. 96). Les 5 autres n'ont pas pu être adaptées au milieu de culture malgré plusieurs tentatives. Ce résultat semble donc refléter une certaine variabilité parmi les souches d'*Acanthamoeba*.

Ces cultures axéniques nous ont servi à instiller des souris par voie nasale selon les méthodes indiquées précédemment (Cf. p. 74). Actuellement, 13 des 15 souches axénisées ont été ainsi testées sur la Souris, deux autres sont en voie de l'être.

L'ensemble des résultats de nos essais est consigné dans le Tableau IX. p.96. L'analyse de ces résultats nous inspire les remarques suivantes.

■ Huit des 13 souches d'*Acanthamoeba* inoculées ont entraîné la mort des souris après instillation nasale. Cette proportion élevée de souches pathogènes mérite d'être soulignée car rarement signalée jusqu'ici depuis que Culbertson (62,63) a isolé la souche *Acanthamoeba culbertsoni* A1, quoique plusieurs auteurs aient démontré l'existence de souches pathogènes appartenant au genre *Acanthamoeba*. Ainsi : Singh et Das (216) ont prouvé le pouvoir pathogène de 12 souches d'*A. rhysodes* isolées en Inde et aux USA ; Jadin (108) a également isolé 2 souches d'*Acanthamoeba* pathogènes pour la Souris, l'une à partir des selles diarrhéïques d'un enfant, et l'autre dans une piscine. Culbertson (64,66,68) lui-même signale à plusieurs reprises l'existence de telles souches auxquelles il attribue toutefois une virulence plus faible créant une affection évoluant en principe de manière chronique et rarement mortelle pour l'animal.

Ce sont finalement Kasprzak et Mazur (120) qui démontrent que la proportion d'*Acanthamoeba* pathogènes est sans doute beaucoup plus importante qu'on ne le soupçonne : sur 24 souches isolées de différents lacs de la région de Posnam, 18 tuent la Souris après instillation nasale. Nos résultats confirment donc ceux de ces auteurs. Ils indiquent, en accord avec eux, qu'un nombre élevé de souches d'*Acanthamoeba* isolées du milieu exté-

rieur sont capables de provoquer chez l'animal un syndrome de méningo-encéphalite primitive aiguë et mortel.

■ La mortalité dépend visiblement du nombre d'amibes instillées. Cependant, si l'on considère certains résultats consignés dans le Tableau IX. ci-contre, le nombre d'amibes instillées ne peut être considéré que comme un ordre de grandeur très approximatif.

On peut parfaitement admettre les différences importantes de mortalité d'une souche à une autre : ainsi, l'instillation de 60.000 amibes de la souche RH₈d provoque 3 décès sur 4 des souris inoculées, alors que le même nombre de trophozoïtes pour la souche RH₆b n'est suivi d'aucun décès.

Il est, par contre, difficile d'expliquer les variations de mortalité observées quelquefois pour une même souche : dans le cas de la souche ME₂b par exemple, un chiffre d'amibes voisin de 25.000 instillé à deux reprises, entraîne selon le cas 1 décès sur 6, ou 4 décès sur 5. La discordance de ces résultats ne peut s'expliquer que par les multiples difficultés qui rendent aléatoire, et très délicat en pratique, le contrôle rigoureux du nombre d'amibes instillées.

■ Une première difficulté est liée à la sédimentation de la suspension amibienne à l'intérieur de la seringue, au cours d'une série d'inoculations. On s'aperçoit de ce phénomène si l'on prend soin d'effectuer un contrôle continu de la richesse amibienne en cours de manipulation.

Pour remédier à cet inconvénient, nous avons finalement remplacé la seringue graduée au 1/100 ml par une micropipette de précision (GILSON) qui présente un double avantage. Le volume instillé, de 20 μ l est délivré avec une exactitude bien supérieure à celle que permet une seringue graduée au 1/100 ml. Selon le principe des micropipettes, le volume constant est aspiré avant chaque instillation : il devient dès lors possible de renouveler l'homogénéisation de la suspension amibienne entre chaque animal d'une même série expérimentale.

■ Une autre difficulté pouvant faire varier considérablement le nombre d'amibes instillées provient du risque de refoulement par éternuement, ou de régurgitation d'une partie du volume administré.

■ Enfin, la sensibilité plus ou moins grande des souris à l'affection se-

lon leur âge et donc leur poids, nécessite d'avoir à sa disposition des lots parfaitement homogènes.

■ Les auteurs ont rarement insisté sur ces difficultés, en particulier en ce qui concerne l'instabilité de la suspension amibienne. Culbertson (63) puis Cerva (41) ne font que les évoquer. Il est probable qu'elles expliquent en partie, les divergences constatées chez les différents auteurs quant à la détermination des doses pathogènes pour certaines souches comme la souche A1 par exemple (41,65,68,233). Cerva (41) démontre l'influence considérable de la phase de multiplication logarithmique pour déterminer la DL_{50} . Ces discordances se retrouvent d'ailleurs avec les souches de *N. fowleri*. Ainsi, selon Carter (34), 39 trophozoïtes de *N. fowleri* inoculés par voie nasale suffisent à tuer la Souris, alors qu'Ander-son et Miss Jamieson (7) n'obtiennent aucun décès avec 2.000 trophozoïtes provenant d'une souche pourtant isolée d'un cas humain mortel. Il leur faut atteindre des doses de 20.000 amibes pour réussir leur implantation chez l'animal.

Si pour notre part, nous n'avons encore pu établir une DL_{50} d'une façon satisfaisante, nos premiers résultats indiquent d'ores et déjà qu'aucune de nos souches ne manifeste un pouvoir pathogène aussi intense que la souche A1 d'*A. culbertsoni*, puisque nous avons obtenu, pour celle-ci, avec un inoculum de 1.700 trophozoïtes, une mortalité de 100 % (Cf. Tableau IX. p.96). Cette amibe isolée voici bientôt 20 ans paraît donc avoir conservé intégralement son pouvoir pathogène. Ce point précis demanderait à être confirmé, car il va à l'encontre des observations de Stevens et O'Dell (233).

■ Aspect anatomo-pathologique.

La mort des animaux est généralement précédée de signes nerveux évidents tels que convulsions, troubles de l'équilibre, hyperexcitabilité, plus rarement paralysies. A ces symptômes, qui apparaissent en moyenne 2 ou 3 jours avant le décès, succède un état de cachexie complète.

L'autopsie est, autant que faire se peut, pratiquée aussitôt après la mort. Le cerveau est prélevé systématiquement selon la technique de Lépine & Coll.(126). Il nous est également arrivé de prélever d'autres viscères tels que les poumons, le foie, la rate, et les reins.

Planche III.

Photographies n°18 à n°23 : Microphotographies de cerveaux de souris
(coloration : Hémalun-éosine).

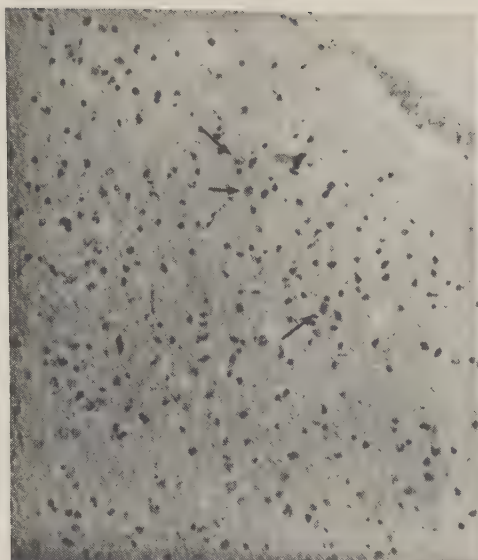
Grossissement : photographie n°18 = x 95 .
photographies n°19 à n°23 = x 945 .

■ Photographie n°18 : Les trois flèches indiquent la présence d'amibes
au faible grossissement.

■ Photographies n°19 à n°22 : Amibes isolées, souche LU₂ a, au sein du tissu
cérébral.

Remarquer la logette de lyse, quelquefois abandonnée, entourant les amibes
et la structure caractéristique de celles-ci : cytoplasme vacuolaire et
noyau à gros nucléole central.

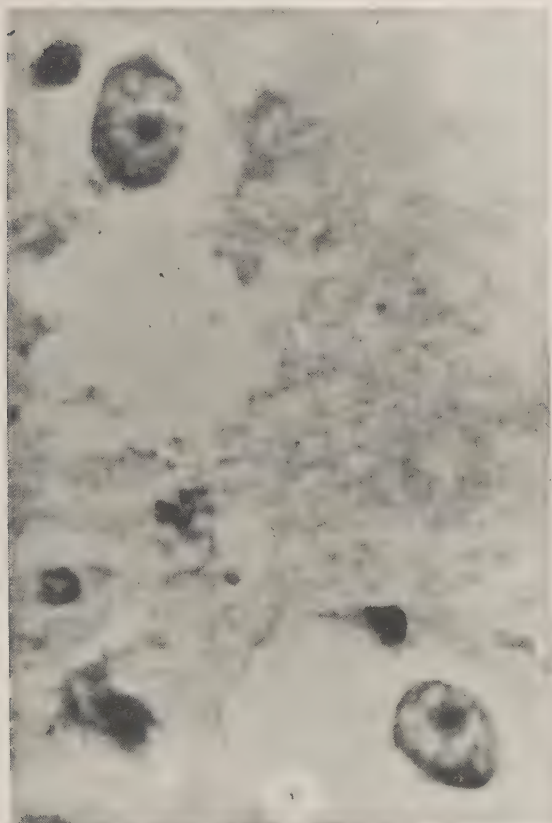
■ Photographie n°23 : Microgranulome inflammatoire à polynucléaires,
centré sur une amibe.



18



19



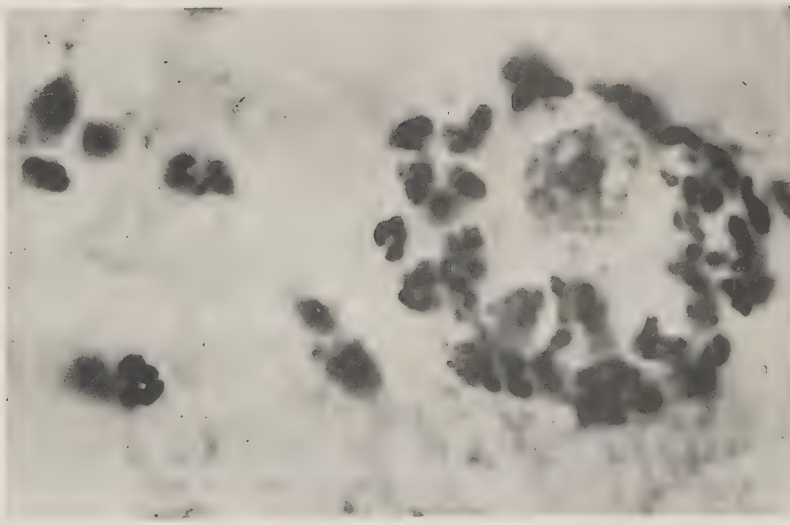
20



21



22



23

La recherche d'amibes a été avant tout réalisée sur les cerveaux. Elle peut se faire par examen direct, mise en culture, ou sur coupes histologiques.

■ Examen direct.

La simple apposition du cerveau sur une lame en présence d'une ou deux gouttes d'eau distillée, permet de retrouver les amibes à condition toutefois, d'utiliser un microscope à contraste de phase. Après quelques minutes, les amibes se repèrent au milieu des hématies et des autres cellules grâce à leur forte réfringence et par l'émission de pseudopodes.

■ Rétroculture.

Le cerveau, ou tout autre viscère, est placé sur une boîte de gélose, en présence d'*Aerobacter aerogenes*. La croissance amibienne est évidente en 2 ou 3 jours. Lamy et Fromentin (123) considèrent d'ailleurs que ce procédé demeure le plus fiable pour retrouver la présence d'amibes pathogènes.

■ Coupes histologiques.

Les cerveaux sont fixés 3 ou 4 jours dans le formol à 10%. Après inclusion dans la paraffine, les coupes sont colorées à l'hémalum-éosine.

L'envahissement du cerveau reste limité aux lobes olfactifs et à la partie antérieure de l'encéphale. Dans les cerveaux les plus envahis, on remarque au niveau méningé une réaction inflammatoire : les vaisseaux apparaissent oedématisés et infiltrés de polynucléaires. Le tissu cérébral, pour sa part, est nécrosé, contenant les amibes qui apparaissent libres et isolées dans des logettes de lyse (Cf. Planche III. n°18 - 22 p.101). Elles se reconnaissent aisément grâce à leur noyau à gros nucléole central ainsi que par leur cytoplasme d'aspect vacuolaire. Leur pénétration s'accompagne d'une réaction inflammatoire le plus souvent diffuse, composée essentiellement de polynucléaires normaux, ou altérés, réduits à leur noyau pycnotique, et d'histiocytes.

Dans certains cas plus rares, on peut observer de véritables microgranulomes. Il s'agit de petits îlots inflammatoires dans lesquels les cellules réactionnelles de défense se disposent en rosettes centrées chacune sur une amibe (Cf. Planche III. n°23 p.101).

■ Cet aspect anatomopathologique traduit et confirme sur le plan histologique, l'évolution et le caractère clinique aigu de l'affection.

■ En effet, à la suite des observations de Culbertson on tend à distinguer, aussi bien sur le plan expérimental que sur le plan clinique, deux types d'affection suivant les espèces en cause (66,68,81). Conformément à cette distinction : *N. fowleri*, chez l'homme et l'animal, et plus accessoirement *A. culbertsoni* chez l'animal, sont responsables d'un syndrome de méningo-encéphalite primitive aiguë hémorragique d'évolution foudroyante et toujours mortelle. Sans doute est-ce en raison de cette rapidité de l'affection létale qu'on ne constate jamais la présence de kystes de *N. fowleri* dans les lésions. Il s'agit donc d'espèces "à haut risque".

Par contre, les souches d'*Acanthamoeba*, de plus faible virulence, provoqueraient plus volontiers des granulomes intracérébraux. L'évolution serait alors chronique, en principe non mortelle. La guérison apparaîtrait en même temps que les amibes s'enkystent dans les lésions.

Il faut cependant se méfier d'une schématisation excessive. Nos résultats montrent que même des souches de "faible virulence" sont capables d'induire, dans un nombre de cas non négligeable (Cf. Tableau IX. p.96), un syndrome de méningo-encéphalite primitive aigu et mortel, comparable à celui provoqué par *N. fowleri* et *A. culbertsoni*. Le caractère aigu de l'affection obtenue avec ces souches banales est, de plus, confirmé par l'absence totale de kystes. Nous n'avons jamais pu mettre en évidence, sur les coupes histologiques, une forme kystique, bien qu'il s'agisse d'*Acanthamoeba*.

■ En corrélation avec les deux processus évolutifs, on tend aussi à établir selon les espèces en cause, une distinction entre les modes de pénétration dans l'organisme (68,134).

L'envahissement du cerveau par voie directe olfactive caractériserait surtout *N. fowleri*, alors que l'instillation nasale de souches d'*Acanthamoeba* serait d'abord suivie d'une dissémination pulmonaire. Dans cette hypothèse, l'invasion du système nerveux central par *Acanthamoeba* n'est plus considérée comme primitive, mais devient secondaire à une dissémination hématogène après atteinte du territoire pulmonaire qui représente la porte d'entrée : l'affection cérébrale, aiguë ou chronique, succède à la pneumonie (Martinez & Coll.(134)).

Sur ce point, nos résultats diffèrent sensiblement de ceux de Martinez qui constate, à l'appui de son hypothèse, essentiellement un envahissement du cerveau moyen. En effet, bien que nous ayons vérifié également, en plusieurs occasions, l'atteinte pulmonaire et même une généralisation à l'ensemble de l'organisme, il nous semble néanmoins que les amibes atteignent le cerveau par pénétration directe et active puisque, à la différence de cet auteur, nous observons uniquement une atteinte des lobes olfactifs et de la partie antérieure du cerveau. Ainsi, même les souches d'*Acanthamoeba* de "faible virulence" sont capables, si on les administre à doses suffisantes, de s'implanter directement au niveau du système nerveux central à la manière des souches de *N. fowleri* ou *A. culbertsoni*, tout en développant simultanément, et parallèlement, une affection généralisée dans tout l'organisme.

■ Il semblerait donc préférable de considérer, en accord avec Culbertson (68) au sujet de la souche A1, que "l'instillation nasale offre aux amibes deux portes d'entrée vers le système nerveux central : l'une par propagation directe, l'autre par extension hémotogène, grâce à la circulation pulmonaire".

■ A notre connaissance, la généralisation de l'affection n'a jusqu'à présent été signalée sur le plan expérimental, que pour les espèces "à haut risque". Culbertson & Coll.(63) retrouvent *A. culbertsoni* non seulement au niveau des poumons mais aussi des reins et de la rate. Carter (34), étudiant la pathogénécité d'une souche de *N. fowleri* isolée d'un cas mortel, fait des constatations identiques. Nous-même, à partir de rétrocultures réalisées avec des broyats de foie, de rate, et de reins, avons pu constater la possibilité d'un envahissement amibien généralisé, même avec nos souches de moindre virulence. Cependant, malgré nos efforts, il nous a été impossible de localiser des amibes sur des coupes histologiques sérieées faites à partir des mêmes organes.

■ Sur le plan clinique, le seul exemple de généralisation dont nous ayons connaissance, est l'observation rapportée par Duma & Coll.(78). Après mise en culture de fragments cérébraux, pulmonaires, hépatiques et spléniques, prélevés par autopsie chez une jeune fille décédée au cours d'une méningo-encéphalite amibienne primitive, ces auteurs isolent *N. fowleri*. L'examen histologique des trois derniers viscères ne leur permet

pas, cependant, de retrouver les amibes.

■ En résumé, les souches d'*Acanthamoeba* que nous avons isolées appartiennent presque toutes aux deux espèces *A. castellanii* et *A. polyphaga*. D'après la littérature il s'agit, en principe, d'espèces non pathogènes, ou de faible virulence. Pourtant, plus de la moitié des souches axénisées, soit 8 sur 13 actuellement, ont été mortelles pour la Souris. Inoculées par instillation nasale, elles ont provoqué des lésions cérébrales d'évolution foudroyante en même temps qu'une atteinte périviscérale.

Donc, sans vouloir dramatiser la situation, les amibes du genre *Acanthamoeba* représentent un danger latent pour les baigneurs si on tient compte, d'une part, de cette faculté que manifestent de nombreuses souches pour passer d'un état de vie libre naturel à un mode de vie parasitaire et, d'autre part, de leur présence fréquente dans les eaux de piscines : 24,7 % des souches isolées (Cf. Tableau VI. p.82).



Observations de Souches de la Famille des Vahlkampfiidae Jollos 1917, Zulueta 1917

■ Nous rappellerons seulement que la famille des Vahlkampfiidae regroupe des amibes à lobopodes éruptifs, dont la division s'effectue sur un mode très particulier qui est celui de la promitose.

Selon Page (156) la famille des Vahlkampfiidae comprend les genres Vahlkampfia, Naegleria, Adelphamoeba, Tetramitus, Heteramoeba.

Nous ne reviendrons pas en détail sur le déroulement de la promitose qui a été décrit plus haut (Cf. Figure 3. p.47) : notre but est simplement d'essayer de montrer que dans ce type mitotique déterminé, une observation attentive du processus de division sur le vivant permet de discerner des particularités propres aux genres ou aux espèces suivant les cas.

■ Au cours de nos investigations, nous avons pu isoler 3 souches de Naegleria et 5 souches de Vahlkampfia. D'autre part, nous entretenons au laboratoire une souche référence de Vahlkampfia avana Page 1967 transmise par l'Institut de Médecine tropicale d'Anvers, qui permettra ainsi d'établir les comparaisons.

Nous verrons donc successivement le résultat de nos observations sur nos souches de Naegleria, puis sur nos souches de Vahlkampfia.

A. Les Souches de Naegleria.

Les caractéristiques de ce genre ont fait l'objet de nombreuses descriptions qu'il paraît inutile de répéter ici (142,169,181,199,201, 214).

1 Morphologie cellulaire.

■ Les formes végétatives des 3 souches isolées correspondent parfaitement à la morphologie habituelle : lobopodes du type éruptif, noyau fréquemment entouré d'une couronne de granules de nature lipoprotéinique. Cette couronne périnucléaire se remarque surtout sur les trophozoïtes assez

âgés, c'est-à-dire sur des microcultures en voie d'enkystement. Les inclusions endoplasmiques se distinguent de façon particulièrement nette au microscope en contraste de phase : ainsi l'observation en immersion permet de retrouver les mitochondries signalées en microscopie électronique (34, 238) (Cf. Planche IV. n°24 - n°25 p.113).

■ Les formes flagellées ont pu être obtenues sans difficulté pour nos 3 souches, en pratiquant un test de flagellation.

■ Aucun caractère morphologique au niveau des formes végétatives ne permet actuellement de faire la distinction entre *N. gruberi*, l'espèce rencontrée couramment, et *N. fowleri*, l'espèce pathogène responsable des cas de méningo-encéphalite primitive.

Les seuls critères dont on dispose sur ce point sont d'ordre biologique tels que des exigences culturelles différentes entre *N. fowleri* et *N. gruberi* (93,245) (Cf. Tableau X. ci-après) ; et surtout d'ordre antigénique : Willaert (246) a démontré par immuno-électrophorèse la parfaite identité antigénique des souches de *N. fowleri* responsables des cas de méningo-encéphalite primitive quelle que soit leur origine géographique, ainsi que leur individualité marquée par rapport aux souches de *N. gruberi*.

■ Nous n'avons pu cultiver axéniquement aucune de nos 3 souches, et leur inoculation n'a été suivie d'aucun résultat : il s'agit donc vraisemblablement de 3 souches de *N. gruberi*.

Tableau X. Critères biologiques des exigences culturelles entre *N. gruberi* et *N. fowleri*.

		<i>N. gruberi</i>	<i>N. fowleri</i>
Culture monobactérienne	à 28 ° C	(+)	(+)
	à 45 ° C	(-)	(+)
Culture axénique	à 37 ° C sur milieu CGVS	(-)	(+)
Pathogénicité		(-)	(+)

■ Kystes.

■ Page (160) vient de signaler récemment l'extrême polymorphisme des kystes de *N. gruberi* selon les souches examinées. D'après lui, il existe 3 catégories morphologiques principales.

■ Le type lisse ("smooth")

où le kyste est plus ou moins sphérique ou ovoïde. La paroi est formée d'une membrane externe mince, lisse, appliquée étroitement à une membrane interne plus épaisse (Cf Planche IV. n°26 p.113).

Dans les kystes appartenant à ce type, les pores sont relativement difficiles à mettre en évidence : en diaphragmant soigneusement ils apparaissent comme de légers épaississements de la paroi.

■ Dans le type rugueux,

la membrane interne présente un contour qui peut aller d'une forme sphérique à une forme plus ou moins angulaire. La membrane externe est souvent séparée de l'interne sauf au niveau des pores. Ceux-ci présentent des bouchons proéminents qui sont de véritables petites protubérances au-dessus du niveau général du kyste.

■ Enfin le troisième type, ou type anguleux, apparaît en quelque sorte intermédiaire entre les deux précédents. Il diffère du type lisse par la plus grande angularité de forme de ses kystes et par l'épaisseur de ses bouchons mais il s'en rapproche par l'apposition étroite des deux membranes.

Jusqu'à présent la majorité des souches examinées par Page appartient au type lisse qui apparaît donc de beaucoup le plus fréquent. Officiellement une seule souche appartient au type rugueux : elle est conservée au C.C.A.P. de Cambridge sous la référence 1518/1 d.

Nous insistons sur cet aspect variable des kystes de *N. gruberi*, souligné par Page, car il semble bien qu'une de nos 3 souches, AU₁, isolée sur un filtre à sable, appartienne au type rugueux moins courant, comme en témoignent nos photographies n°27 - n°28 Planche IV page 113.

■ Nous rappellerons enfin qu'au niveau des kystes, la distinction entre les deux espèces *N. gruberi* et *N. fowleri* est possible, encore que certains points soient l'objet de controverses.

En microscopie photonique les kystes de *N. fowleri* apparaissent démunis de pores, alors que ceux-ci sont, finalement, toujours présents chez *N. gruberi* malgré les variations mentionnées plus haut. Ce fait, remarqué tout d'abord par Carter (34), semble admis par la plupart des auteurs (160,216).

La microscopie électronique a montré qu'en réalité il existait bien des pores au niveau des kystes de *N. fowleri*, mais de structure différente et en moins grand nombre que chez *N. gruberi* : 1,6 contre 7,2 en moyenne. Chez *N. gruberi* le pore est entouré d'une véritable évagination de la paroi. Cette collerette fait défaut chez *N. fowleri*.

Ces observations, réalisées par Jadin en microscopie à balayage (114), et par Schuster en microscopie électronique classique (205), sont d'ailleurs encore discutées. En effet, Lastovica (124) n'a pas pu retrouver, avec des moyens d'investigation comparables, la présence de ces pores chez *N. fowleri*. Devant la difficulté de mise en évidence de ces pores chez les kystes de *N. fowleri*, il vaut peut-être mieux, pour l'instant, s'en tenir aux notions classiques de microscopie photonique en attendant de disposer d'une méthode spécifique pour les révéler.

■ Promitose.

Nous insisterons plus longuement sur les modalités de la prometose telles que nous avons pu les observer sur le vivant, à l'occasion de l'étude de ces 3 souches.

■ Le début de la prometose chez *Naegleria*, se déroule selon le processus habituel : conservation des mouvements amoeboïdes, persistance de la membrane nucléaire, étirement progressif du nucléole qui prend une forme en sablier (Cf Planche IV n°29 p.113), puis se scinde à la fin de la prophase pour donner naissance aux corps polaires (Cf Planche IV n°30 p.113).

■ Par contre, l'évolution ultérieure de la prometose, chez *Naegleria*, présente deux particularités méritant d'être signalées.

■ La plaque équatoriale métaphasique est plus difficile à percevoir que chez les amibes du genre *Vahlkampfia*.

■ Une deuxième particularité se relève au cours de l'anaphase et se re-

trouve ensuite jusqu'à la fin de la promitose.

■ A cette étape de la division, caractérisée par l'ascension des corps polaires et par l'amorce d'une constriction de la membrane nucléaire, on voit nettement apparaître une nouvelle formation située entre les 2 corps polaires, mais séparée d'eux par un espace libre. Cette formation, qui a reçu le nom de "corps intermédiaire" ("interzonal body" des auteurs anglo-saxons), a été observée par la plupart des auteurs, généralement sur des préparations fixées et colorées (53,71,90,142,169,181,214). Nos documents montrent qu'elle est aussi parfaitement visible sur le vivant (Cf Planche IV n°29 & n°31 p.113).

■ La nature exacte du "corps intermédiaire" n'est pas encore élucidée : pour certains il serait d'origine nucléolaire (99). D'après nos observations sur le vivant, sa formation apparaît effectivement comme un redéchirement des corps polaires au cours de l'ascension anaphasique. Mais cette constatation n'a encore reçu aucune confirmation.

La présence de cette formation constitue un sujet de controverse entre les différents auteurs. Certains affirment qu'elle est toujours présente (53,181,214), tandis que pour d'autres (142,169), elle peut manquer de façon sporadique chez certains individus d'une même souche. D'après nos observations, cette formation est présente dans l'immense majorité des cas ; toutefois nous avons pu constater son absence au cours de promitoses d'évolution particulièrement lente, comme "bloquées".

■ En fin d'anaphase et au cours de la télophase, le "corps intermédiaire" subit à son tour l'étirement progressif et la constriction du noyau : il finit par se rompre en même temps que celui-ci. A la télophase, avant même que s'amorce la cytodiérèse, les deux noyaux-fils présentent donc deux masses distinctes : l'une résulte de la scission du nucléole à la prophase et représente le corps polaire, tandis que l'autre provient de la cassure du "corps intermédiaire" (Cf Planche IV n°32 p.113).

■ La cytodiérèse intervient ensuite pour libérer les deux cellules-filles : elles évoluent, durant un laps de temps assez long, avec un noyau qui renferme donc ces deux formations : il faut prendre garde de ne pas confondre l'aspect présenté alors avec celui d'une cellule en

Planche IV.

Souches de *Naegleria gruberi* .: $RH_6a.$ & $AU_1.$

Photographies n°24 à n°32 : Microphotographies prises sur le vivant

▷ en contraste de phase (n°24 et 25)(n°29 à n°32)

▷ en contraste de phase "Anoptal" (n°26 et 27)

▷ en lumière directe (n°28)

Grossissement : x 1500

■ Photographies n°24 & n°25 : Formes végétatives (souche $RH_6a.$).

■ Photographie n°26 : Kyste de type lisse (souche $RH_6a.$).

■ Photographies n°27 & n°28 : Kystes de type rugueux (souche $AU_1.$).

Membrane externe nettement séparée de l'enveloppe interne. Les flèches indiquent l'emplacement des pores à bouchons proéminents.

■ Photographie n°29 : Stade prophasique (cellule du haut avec un nucléole en sablier)
et stade anaphasique (cellule du bas avec corps polaires et "corps intermédiaire").

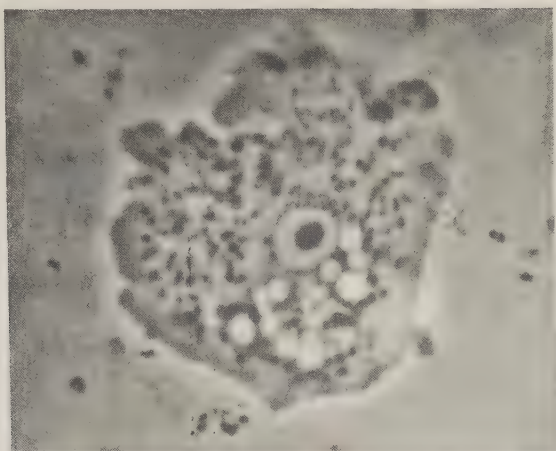
■ Photographie n°30 : Forme végétative et cellule en métaphase avec ses 2 corps polaires.

■ Photographie n°31 : Anaphase avec corps polaires et "corps intermédiaire"

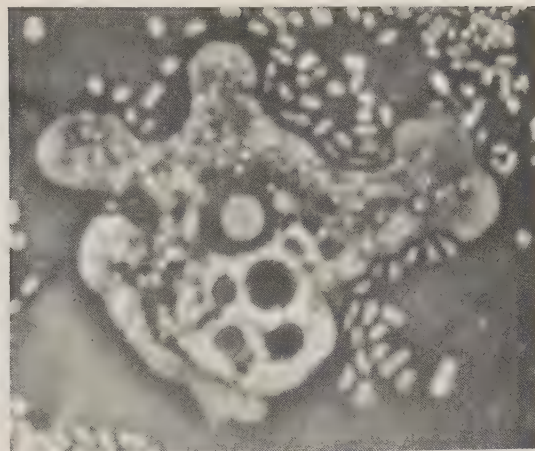
■ Photographie n°32 : Télophase : chaque noyau-fils contient deux inclusions, le corps polaire (apical) et un fragment du "corps intermédiaire" (basal).

Légendes apparaissant en regard des flèches :

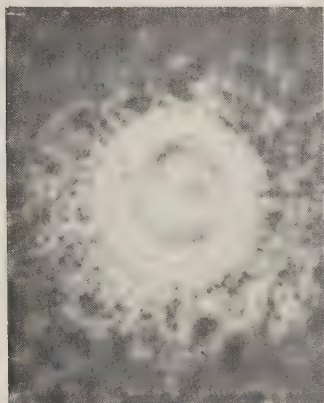
$\boxed{c.i.}$ = "corps intermédiaire" ; $\boxed{c.p.}$ = corps polaires



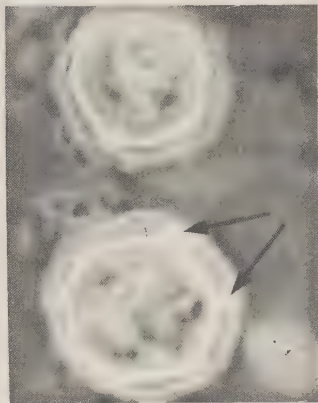
24



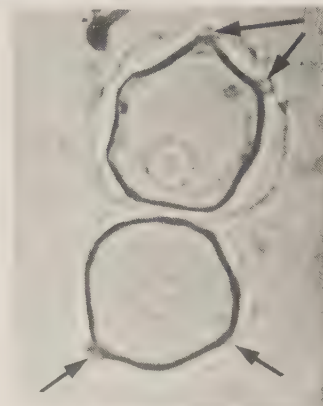
25



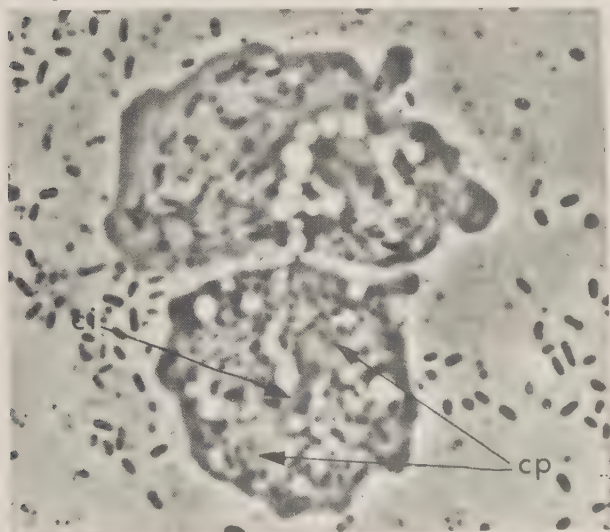
26



27



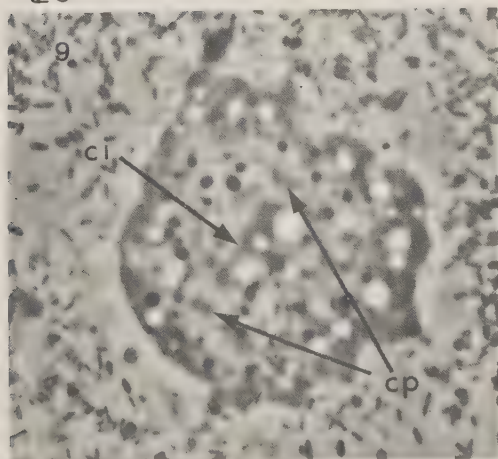
28



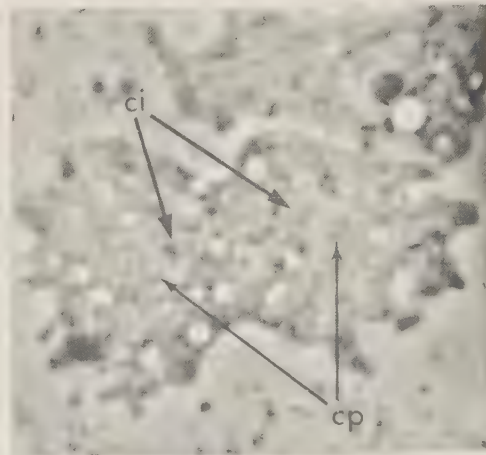
29



30



31



32

début de division. Par la suite on pourra, d'ailleurs, constater la fusion progressive des deux inclusions du noyau, qui redonne le nucléole habituel unique.

En résumé, la promitose du genre *Naegleria*, telle que nous avons pu la suivre sur le vivant, présente deux caractéristiques essentielles.

L'évolution du matériel chromatinien n'est pas suivie avec la netteté observée généralement chez les *Vahlkampfia*.

En raison de sa présence quasi constante à la fin de la promitose, le "corps intermédiaire" nous paraît être un critère valable, à la fois d'identification du genre *Naegleria* et de différenciation avec le genre *Vahlkampfia*.

B. Les Souches de *Vahlkampfia*.

■ Page (156) a récemment recensé 25 espèces appartenant à ce genre, en créant lui-même, sept.

■ Le genre *Vahlkampfia* se différencie bien du genre *Naegleria* par l'absence de formes flagellées. Comme lui, il regroupe des amibes à mouvements éruptifs et se divisant par promitose. L'existence de ce genre est reconnue par la plupart des auteurs, à l'exception de Singh (214) qui préfère sa dénomination générique personnelle : "*Schizopyrenus*".

■ En revanche il ne nous semble pas que les diagnoses actuelles permettent une identification correcte des espèces. Les descriptions pèchent généralement par le manque de caractères réellement spécifiques. Le mode mitotique n'a été souvent que seulement mentionné.

Nous rattacherons à ce genre, 5 souches parmi celles que nous avons isolées. Pour les raisons que nous venons d'évoquer, plutôt que d'entreprendre une description séparée pour chacune d'entre elles, nous préférons examiner globalement, à l'occasion de ces cinq exemples, les principaux éléments habituels de la diagnose des amibes : trophozoïtes, kystes, mitose. Nous noterons, pour chacun de ces stades, les différences que nous avons pu relever au cours de la comparaison des 5 souches

auxquelles nous avons joint une souche référence, *V. avara* Page 1967, qui nous a été fournie par l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers.



Planche V.

Souche Référence de *Vahlkampfia avara* Page 1967

Photographies n° 33 à n° 38 : Microphotographies prises sur le vivant en contraste de phase.

Grossissement : x 1500

■ Photographies n° 33 & n° 34 : Stades prophasiques.

Allongement du nucléole (n°33) et aspect ultérieur "en sablier" (n°34).

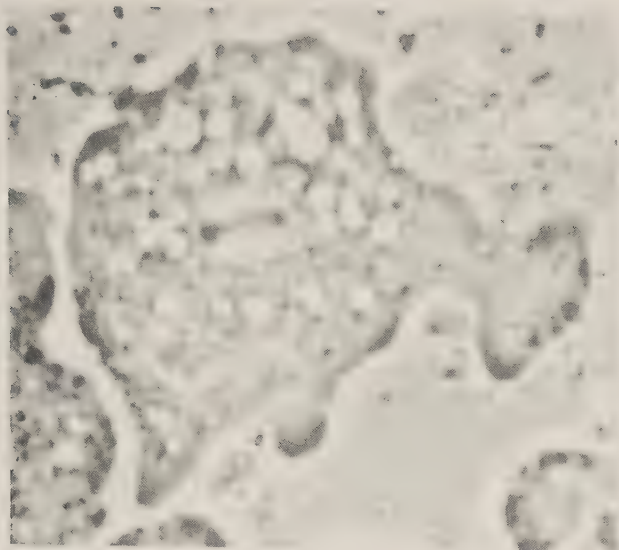
■ Photographies n° 35 à n° 37 : Stades métaphasiques.

Corps polaires bien développés en calotte hémisphérique.

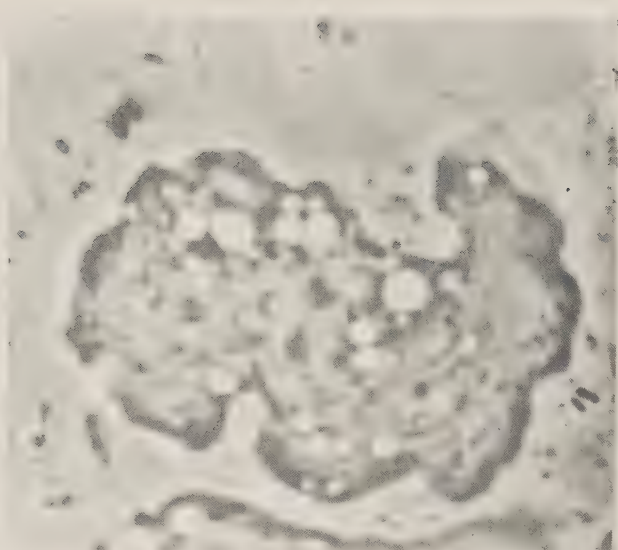
■ Photographie n° 38 : Anaphase.

Légendes apparaissant en regard des flèches :

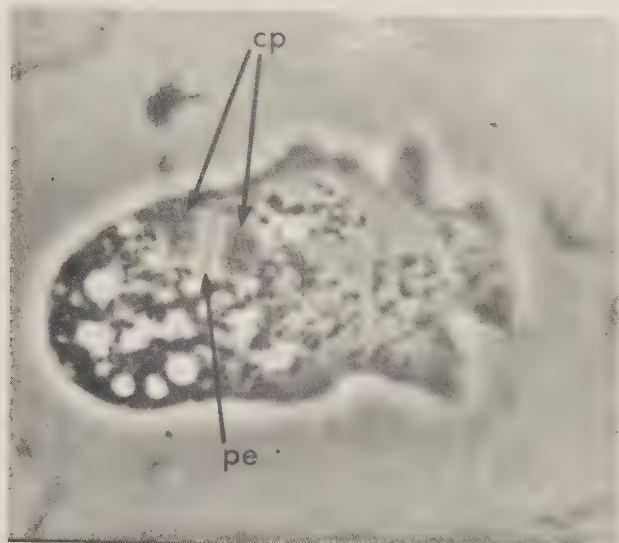
c.p. = corps polaires ; p.é. = plaque équatoriale



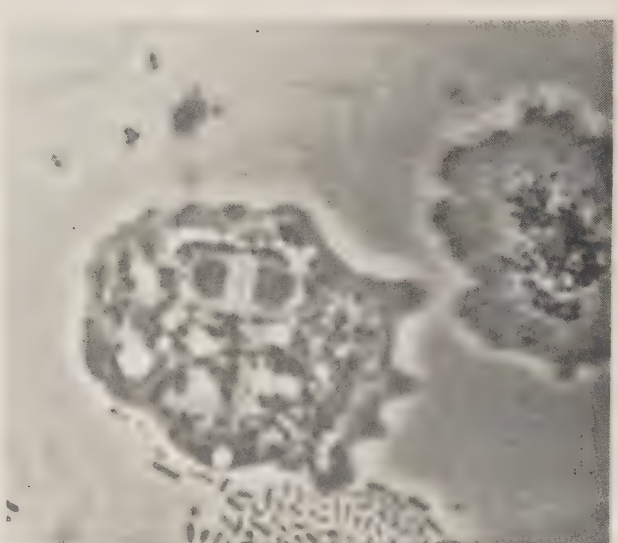
33



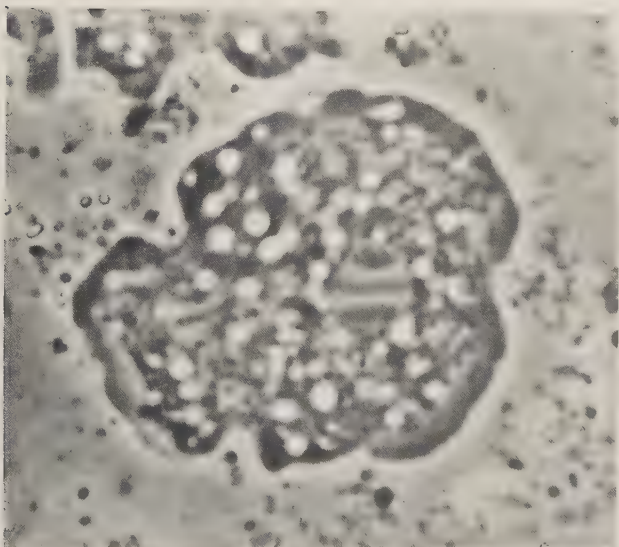
34



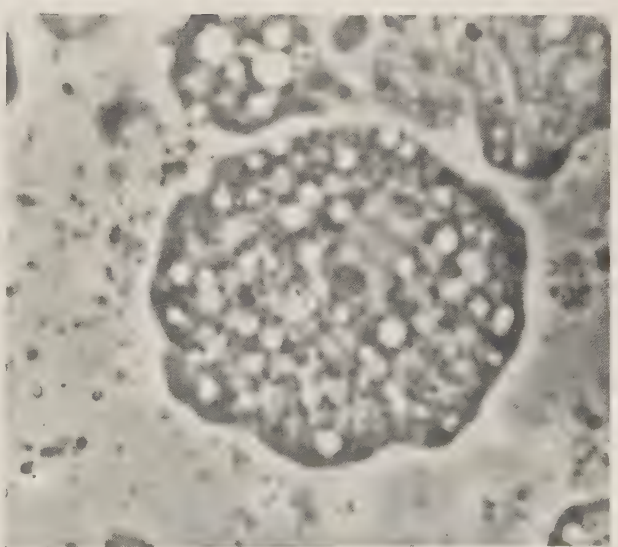
35



36



37



38

■ Les Formes végétatives.

Les trophozoïtes ne se prêtent guère à l'établissement de différenciations précises entre espèces du genre *Vahlkampfi* : ce qui rend, à notre avis, illusoirs les longues descriptions entreprises à ce stade.

Il s'agit en effet, dans tous les cas, d'amibes émettant les lobopodes éruptifs habituellement décrits et dont le test de flagellation est resté négatif (Cf. Planches VI. (n°39 & n°40) ; VII. (n°52 - n°54) ; VIII. (n°61 - n°63) ; IX. (n°73 à n°76) ; XI. (n°85 & n°86) à partir de la page 127). L'existence d'une touffe collopodiale reste facultative.

■ Les seules différences importantes que nous avons notées portent sur le complexe vacuolaire et sur les dimensions des formes végétatives.

■ Chez 4 de nos souches (GE_1a . RH_3a . GE_1b . RH_5f .) ainsi que chez *V. avara*, la vacuole contractile principale résulte de la coalescence de plusieurs petites vacuoles. Ce territoire pulsatile est en principe localisé à la partie postérieure de la cellule, souvent à proximité du noyau. Cette disposition correspond à l'aspect habituellement décrit du complexe vacuolaire chez les *Vahlkampfiidae*.

Toutefois cette organisation des vacuoles contractiles n'est pas absolument spécifique, car nous avons pu observer une autre répartition. Ainsi, chez notre souche RH_5b , on ne peut pas individualiser de territoire pulsatile principal : les vacuoles sont disséminées dans l'ensemble du cytoplasme et fonctionnent indépendamment (Cf Planche IX. n°73 à n°76 p. 141).

■ Les mensurations de formes végétatives sur le vivant sont bien sûr entachées d'une grande imprécision : elles sont surtout données à titre indicatif et pour fixer l'ordre de grandeur. Dans ces conditions, seules des différences importantes permettent de penser qu'il ne s'agit pas de mêmes espèces.

Les dimensions moyennes que nous avons obtenues pour nos 5 souches sont les suivantes :

Souches :	$V. avara$	GE_1a	RH_3a	GE_1b	RH_5b	RH_5f
Dimension en μm :	33,2	32,8	34,8	25,8	67,8	26,25

On voit tout de suite que le seul critère de la dimension des trophozoïtes permet de distinguer nettement une souche comme RH_5b , alors qu'il montre une différence moins significative entre un groupe de souches comme $V. avara$, GE_1a , RH_3a , d'une part, et des souches comme GE_1b , et RH_5f d'autre part.

■ Les Kystes.

On serait tenté de croire que les mensurations de kystes sont plus précises et plus fiables que les mesures de formes végétatives. En fait, même ce caractère, pris isolément, doit être interprété avec beaucoup de prudence et perd une partie de sa valeur informative si l'on tient compte, en premier lieu des variations de formes importantes observées chez la plupart des espèces de la famille des Vahlkampfiidae. Bien que les kystes ronds prédominent, toutes les transitions sont possibles, depuis les formes ovoïdes jusqu'à celles "en croissant", suivant le mode de groupement des kystes au moment de l'enkystement. En second lieu : des variations présentées par les mesures kystiques elles-mêmes, des écarts sur le diamètre moyen des kystes pouvant être notés, soit à court terme, c'est-à-dire en fonction de la durée d'enkystement, soit à long terme, c'est-à-dire apparaissant à la suite de plusieurs années de repiquages. Enfin, des différences, souvent minimes, sont relevées entre les espèces.

■ Nous consignons dans le Tableau XI. ci-dessous, les résultats obtenus avec nos souches en effectuant, pour certaines d'entre elles, deux séries de mesures à environ 1 an d'intervalle.

Tableau XI. Mensuration de kystes appartenant à 6 souches de Vahlkampfiidae

	V. avara	GE ₁ a.	RH ₃ a.	GE ₁ b.	RH ₅ b.	RH ₅ f.
Printemps 1975 (Ø en µm)	mesures non faites	$\bar{x} = 11,1$	$\bar{x} = 11,8$	$\bar{x} = 9,1$	$\bar{x} = 20,9$	mesures non faites
Printemps 1976	$\bar{x} = 10,7$	$\bar{x} = 9,7$	$\bar{x} = 11,2$	$\bar{x} = 7,7$	mesures non faites	$\bar{x} = 11,7$
Ecart-type σ (Ø en µm)	σ 1,45	σ = 1,2	σ = 1,1	σ = 1,2	σ 1,45	σ = 1,6

Les souches correspondant à des espèces distinctes sont séparées par des doubles traits verticaux. N.B. : selon Page : Ø de *V. avara* = 9,7 µm.

Ces résultats montrent qu'à une même époque, des différences assez importantes peuvent être relevées, non seulement entre des souches que nous considérons comme des espèces distinctes, mais aussi entre deux souches à notre avis identiques comme $GE_1a.$ et $RH_3a.$ (printemps 1976).

D'autre part, il existe également des différences sensibles pour une même souche à deux périodes données, par exemple pour $GE_1a.$, ou $GE_1b.$

■ Comme ces mesures (Tableau XI ci-contre) portaient sur des kystes d'âge variable, nous avons recommencé une troisième série de mesures, en examinant cette fois des cultures de durée d'enkystement identique. Les résultats obtenus sur des kystes de 100 jours figurent dans le Tableau XII. en diamètre moyen pour chaque souche :

	$GE_1a.$	$RH_3a.$	$GE_1b.$	$RH_5b.$	$RH_5f.$
$\bar{\varnothing}$ moyen μm	$\bar{x} = 10,8$	$\bar{x} = 12,0$	$\bar{x} = 8,5$	$\bar{x} = 14,5$	$\bar{x} = 9,8$
Ecart-type σ	$\sigma = 1,3$	$\sigma = 1,1$	$\sigma = 1,4$	$\sigma = 2,1$	$\sigma = 1,5$

Par comparaison, ces écarts restent du même ordre de grandeur que ceux signalés par Page (160) pour les kystes de *N. gruberi* dont le diamètre moyen varie de $10,4 \mu m$ à $15,2 \mu m$ selon les souches examinées. L'écart maximum trouvé par cet auteur, à 10 ans d'intervalle pour ces souches, est en principe satisfaisant, puisqu'il ne dépasse pas généralement $1,2 \mu m$. Cependant, pour 2 d'entre elles, il atteint 3 et $3,1 \mu m$.

■ La Division.

► Dans ces conditions, l'étude de la mitose revêt un intérêt particulier. Or, jusqu'à présent, dans les descriptions d'amibes du genre *Vahlkampfia*, la division par promitose n'est souvent que simplement mentionnée.

A partir de l'examen de nos 5 souches et de celle de *V. avara*, il nous semble que la promitose peut se présenter sous des aspects assez variés. Nous avons choisi de comparer globalement les 6 souches au cours de chaque étape de la division, espérant rendre ainsi plus sensibles cer-

taines particularités.

■ Prophase.

Dès ce stade, on remarque que le nucléole présente un aspect variable suivant les souches.

■ Chez l'une d'entre elles, $GE_1b.$, ainsi que chez *V. avara* mais à un moindre degré, le nucléole conserve tout au long de la prophase un aspect net et un contour bien marqué. Il subit cependant un changement très important en perdant progressivement sa forme sphérique habituelle pour devenir très allongé, presque rectangulaire (Cf Planche V. n°33 p.117 et Planche VI. n°41 & n°42 p.129).

Ensuite, de façon très progressive, presque insensiblement, le nucléole se rétrécit dans sa partie médiane en même temps qu'il achève son étirement. En fin de prophase les corps polaires, avant leur séparation définitive, ne sont plus réunis que par un fin cordon nucléolaire (Cf Planche V. n°34 p.117 et Planche VI. n°43 & n°44 p.129). La figure ainsi formée évoque parfaitement soit une haltère - $GE_1b.$ -, soit un sablier ou une bobine de diabololo - *V. avara* -.

La prophase dans le cas de ces souches $GE_1b.$ et *V. avara* se caractérise donc par une bonne conservation du nucléole et par une évolution pratiquement symétrique, qui aboutit à une répartition équivalente du matériel nucléolaire au moment de la scission des corps polaires.

■ Par contre, pour nos autres souches $GE_1a.$ $RH_3a.$ $RH_5b.$, le début de la prometose se déroule en quelque sorte à l'inverse de ce que nous avons observé pour $GE_1b.$ Cette fois-ci, la prophase se remarque au contour moins net du nucléole, qui prend un aspect flou parfois à la limite de la visibilité : son évolution devient alors difficile à suivre, mais reste possible à observer sur le vivant.

Outre la perte de l'intégrité du nucléole, on constate que son étirement se fait mal : l'allongement et la constriction médiane sont moins prononcés que chez les souches précédentes : la figure en sablier n'est ici qu'ébauchée (Cf Planche VII. n°55 - n°58 ; Planche VIII. n°64 - n°67 pp.133 et 137). Quelquefois, - chez $RH_5b.$ -, l'étirement nucléolaire s'effectue sur le côté et non par le milieu (Cf Planche X. n°77 & n°78 p.145).

Cette prophase, apparemment laborieuse, se termine assez souvent par une rupture asymétrique du nucléole qui donne une répartition inégale du matériel nucléolaire à chaque pôle du noyau.

■ A la limite, le rattachement de la division au type promitotique peut même devenir équivoque.

Ainsi, chez la souche RH₅f., la prophase est marquée simplement par la forme allongée, le contour irrégulier du nucléole, qui s'estompe ensuite fortement sans qu'il soit possible, à aucun moment, d'observer un aspect en sablier (Cf Planche XI n°87 - n°89 p.149). La désintégration se poursuit à l'extrême, pratiquement comme au cours d'une mitose banale. On ne peut donc pas suivre la répartition précise du nucléole qui paraît se redistribuer à l'ensemble du noyau : le suc nucléaire examiné en contraste de phase devient à partir de ce moment, plus sombre qu'en période interphasique (Cf Planche XI. n°90 - n°92 p.149).

On peut s'étonner que nous maintenions l'évolution de la souche RH₅f. dans le cadre de la promitose. Nous préférons, cependant, choisir cette interprétation en raison du mode de déplacement des formes végétatives par lobopodes éruptifs et de l'existence d'autres faits habituellement caractéristiques de la promitose. RH₅f., en effet, conserve nettement ses mouvements amoeboïdes jusqu'à la métaphase, stade où l'on assiste à un net ralentissement de l'activité sans jamais observer toutefois, l'arrondissement caractéristique des amibes se divisant par méso ou métamitose. Enfin, on note, comme au cours de toute promitose, une persistance de la membrane nucléaire jusqu'à sa rupture en fin d'anaphase.

■ Métaphase.

► Des différences sont également notées suivant les souches, au moment de la métaphase : elles portent, d'une part sur la forme présentée par les corps polaires, d'autre part sur le moment d'apparition de la plaque équatoriale.

■ Chez GE₁b. et V. avara, les corps polaires gardent un aspect dense. Leur forme régulière en calotte sphérique, quelquefois parfaitement hémisphérique chez V. avara, remplit bien l'espace offert à l'intérieur de la membrane nucléaire. Le contour du noyau demeure plutôt arrondi. (Cf Planche V. n°35 - n°37 p.117 et Planche VI. n°45 & n°46 p.129).

■ Au contraire, chez les souches dont l'évolution du nucléole est plus hésitante à la prophase, - $GE_1a.$, $RH_3a.$ -, le noyau présente, tout au long de la prométaphase, un contour plus elliptique que précédemment. A l'intérieur, les corps polaires sont oblongs, et tendent vers une forme plus ou moins triangulaire dont la pointe ferait face à la plaque équatoriale ; en outre, ils n'occupent pas la totalité de l'espace nucléaire (Cf Planches VII. n°59 & n°60 p.133 et VIII. n°68 p.137) et apparaissent même punctiformes au cours de quelques observations chez $RH_3a.$ Leur texture est généralement plus lâche, moins dense que pour les souches précédentes, presque lacérée chez $RH_3a.$ (Cf Planche VIII. n°69 p.137).

■ Chez $RH_5b.$ les corps polaires, quoique bien développés, offrent souvent une forme assez irrégulière, un aspect finement peigné, et leur bordure inférieure est comme frangée (Cf Planche X. n°79 - n°81 p.145).

■ Notre souche $RH_5f.$ continue à faire exception car, au moment de la métaphase, il n'est toujours pas possible d'individualiser des corps polaires (Cf Planche XI. n°93 p.149) : ceux-ci vont se former très rapidement au moment de l'anaphase et à partir de cet instant, la fin de la division de $RH_5f.$ ressemblera donc exactement à une promitose banale (Cf. Planche XI. n°94 - n°96 p.149 et Planche XII. n°97 - n°100 p.153).

► Enfin, une distinction peut être faite suivant le moment de formation de la plaque équatoriale.

Certaines souches, - $GE_1a.$ $RH_3a.$ $RH_5b.$ -, sont caractérisées par une apparition précoce de la plaque équatoriale, qui devient visible avant même la séparation des corps polaires au niveau de l'étranglement (Cf Planches VII. n°56 - n°58 & VIII. n°65 & n°67 pp.133 & 137).

Au contraire, chez une souche comme $GE_1b.$, l'apparition de la plaque équatoriale est comme différée. Elle ne devient visible qu'après la rupture du nucléole : la cellule en division peut évoluer quelques instants avec ses deux corps polaires opposés avant que ne se forme la plaque métaphasique.

■ Anaphase.

En raison de sa rapidité d'évolution, le troisième temps de la division ne permet guère d'établir des différences importantes dans le com-

portement des souches. Parfois, comme c'est le cas pour la souche $GE_1b.$, on observe avec netteté la scission de la plaque équatoriale et l'ascension des deux lots chromosomiques (Cf Planche VI. n°47 - n°51 p.129). Le plus souvent le matériel chromatinien s'estompe et devient brusquement difficile à observer. C'est le cas des souches $GE_1a.$, $RH_3a.$ et $RH_5b.$ (Cf Planche VIII. n°70 p.137 & Planche X. n°82 - n°84 p.145).

■ En ce qui concerne la souche $RH_5f.$ nous rappelons que c'est à partir de cette phase seulement, que s'individualisent les corps polaires (Cf. Planches XI. n°94 - n°96 et XII. n°97 - n°100 pp.149 & 153).

► Ces variantes notées dans le processus de la promitose s'accompagnent d'ailleurs d'une différence dans la durée de son déroulement : elle prend en moyenne 15 mn. chez des amibes comme $GE_1a.$, $RH_3a.$ mais, à l'inverse, chez $GE_1b.$, s'effectue avec une lenteur particulière puis qu'elle demande en moyenne près de 50 mn.

► Ainsi l'observation de la promitose sur le vivant nous paraît fournir autant d'informations que l'examen des formes végétatives ou des kystes de *Vahlkampfia*. Nous pensons que la division cellulaire de ce genre n'a pas encore reçu toute l'attention qu'elle mérite. Des caractères tels que l'évolution générale du nucléole à la prophase, l'aspect des corps polaires, le moment d'apparition de la plaque métaphasique, devraient être pris en considération.

Nous ne prétendons pas que l'étude de la promitose permettra, à elle seule, une identification correcte des espèces de *Vahlkampfia* et nous nous garderons également de schématiser différents types de promitose : nos observations sont encore trop fragmentaires pour qu'on puisse envisager de les généraliser. L'examen de ces six souches tend seulement à montrer que la promitose a dû subir toute une évolution s'effectuant comme une transition progressive vers la division des cellules supérieures.

Au départ seraient des amibes comme $GE_1b.$ de promitose typique et parfaite, puis apparaîtraient des "promitoses" très proches du mode de division des cellules supérieures tel qu'il se retrouve, d'ailleurs, chez la plupart des amibes, $RH_5f.$, avec effacement presque complet du nucléole, en constituant un exemple.

Entre ces deux extrêmes on peut imaginer toutes les gradations. Des souches comme GE_1a , RH_3a , et RH_5b , où la promitose, indiscutable, paraît déjà plus hésitante, représentent peut-être un de ces intermédiaires.

■ Discussion.

En comparant les cinq souches de *Vahlkampfia* isolées par nous, aux espèces actuellement décrites, nous faisons les remarques suivantes.

■ Aucune de nos souches ne paraît correspondre à *V. avara*.

En effet, si la promitose de cette espèce et celle de GE_1b , ont un déroulement comparable, GE_1b , s'éloigne nettement de *V. avara* par la dimension de ses kystes et de ses formes végétatives.

■ Les souches GE_1a , et RH_3a , nous paraissent identiques.

Elles se rapprochent de *V. avara* si l'on ne tient compte que de leurs dimensions. Par contre l'évolution du nucléole au cours de la promitose permet, nous l'avons vu, de relever des différences, à notre avis importantes.

■ Plusieurs éléments nous permettent de rapprocher la souche RH_5b , de *Vahlkampfia ustiana* Page 1974. Cet auteur (156) signale en effet pour cette espèce des dimensions importantes. La longueur moyenne des formes végétatives, $42\ \mu m$, est inférieure à la nôtre ($67,8\ \mu m$), mais Page travaille sur des cellules moins étalées puisque "en goutte pendante". Le diamètre moyen des kystes est également élevé à $15,4\ \mu m$. Il mentionne aussi d'autre part, plusieurs vacuoles contractiles. Enfin, les dessins de Page sur la promitose de *V. ustiana* correspondent assez bien à nos propres microphotographies : ils traduisent, selon l'auteur, l'aspect fragmenté et irrégulier des corps polaires.

■ La souche de RH_5f , dont la mitose est très particulière, donnera vraisemblablement lieu à la création d'une nouvelle espèce.

Planche VI. : Souche GE₁b. : Vahlkampfia, sp.

Planche VI.

Souche GE₁b. : Vahlkampfia sp.

Photographies n° 39 à n° 51 : Microphotographies prises sur le vivant
en contraste de phase.

Grossissement : x 1.500

■ Photographies n° 39 & n° 40 : Formes végétatives.

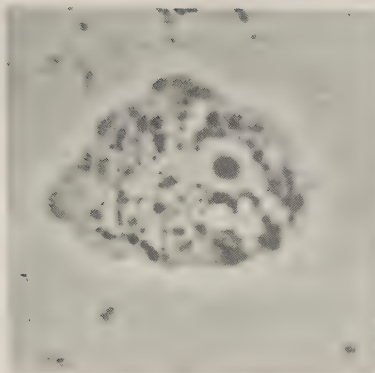
■ Photographies n° 41 à n° 44 : Stades prophasiques.

Remarquer l'allongement du nucléole et la formation très progressive des
deux corps polaires qui sont encore reliés par un fin ligament nucléolaire
sur la photographie n° 44 .

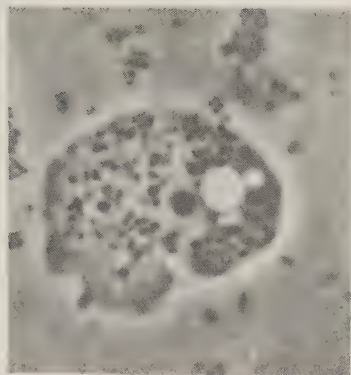
■ Photographies n° 45 & n° 46 : Métaphase.

■ Photographies n° 47 à n° 51 : Anaphase.

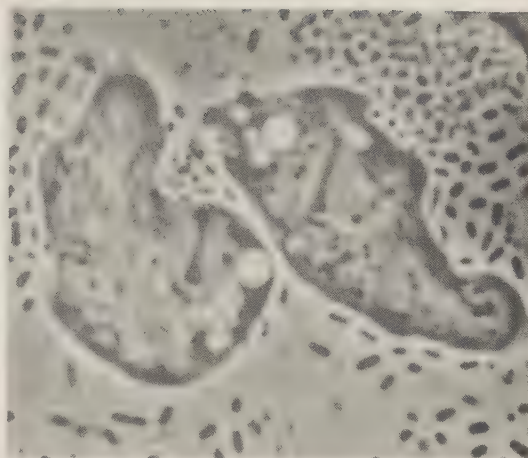
L'ascension des deux corps polaires et des deux plaques chromosomiques
est suivie avec netteté.



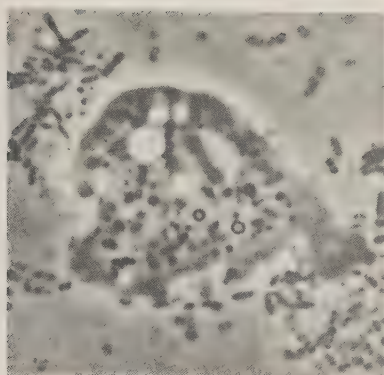
39



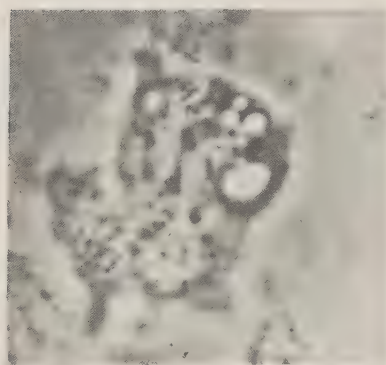
40



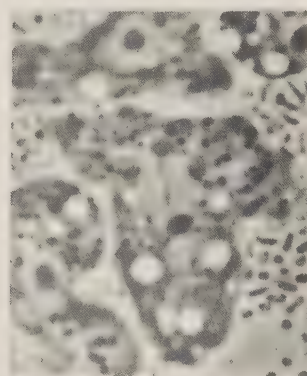
41



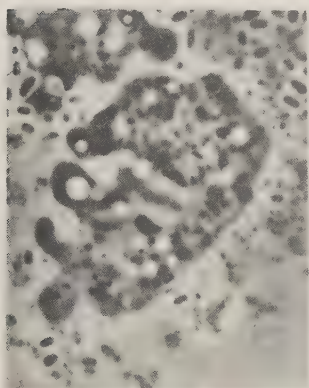
42



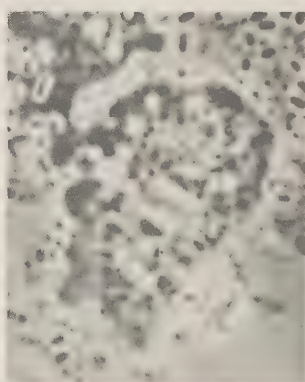
43



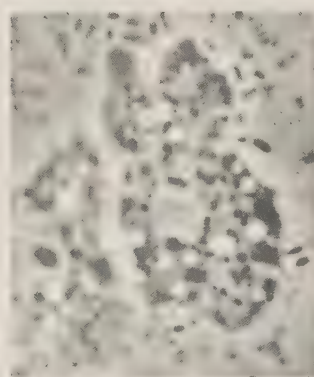
44



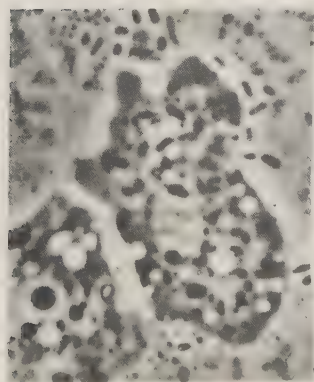
45



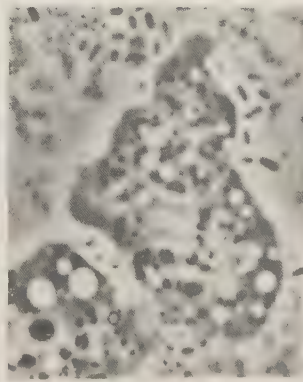
46



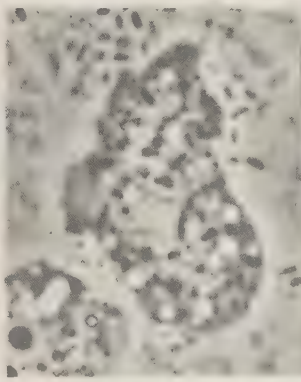
47



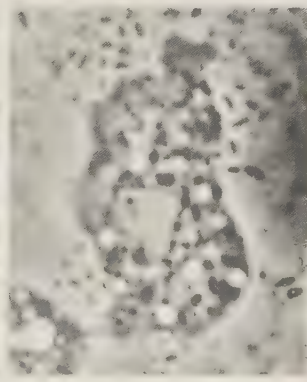
48



49



50



51

Planche VII. : Souche GE₁a. : Vahlkampfia sp.

Planche VII.

Souche GE ₁ a. : Vahlkampfia sp.

Photographies n° 52 à n° 60 : Microphotographies prises sur le vivant
en contraste de phase.

Grossissement : x 1.500

■ Photographies n° 52 à n° 54 : Formes végétatives.

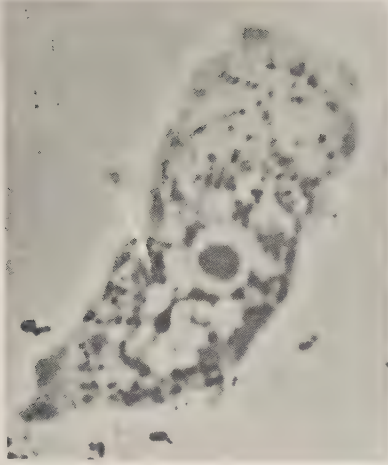
■ Photographies n° 55 à n° 58 : Stades prophasiques.

L'allongement et l'étirement de la partie centrale du nucléole sont beaucoup moins prononcés que chez la souche précédente (n°33,34,41,44). La plaque chromosomiale est déjà visible au niveau de la constriction médiane du nucléole.

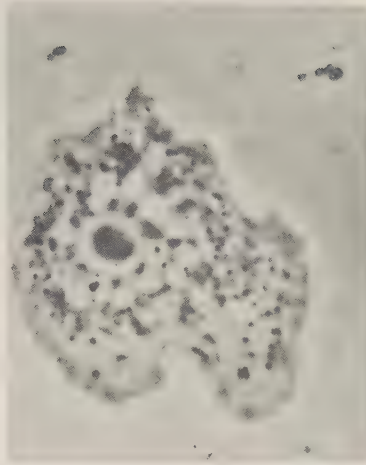
■ Photographies n° 59 & n° 60 : Métaphase.

Légendes en regard des flèches :

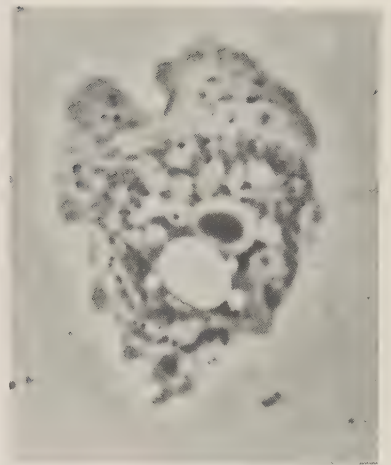
[c.p.] = corps polaires ; [p.é.] = plaque équatoriale



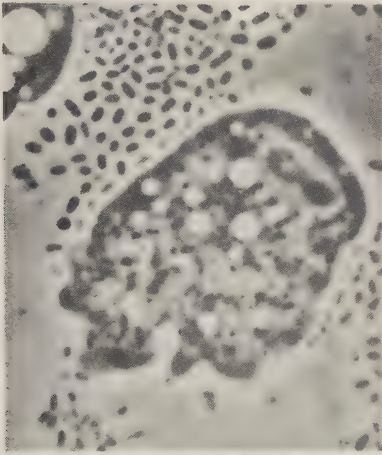
52



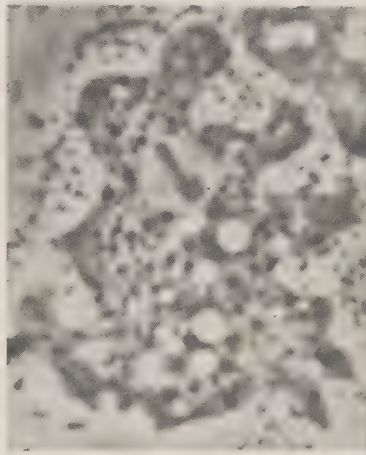
53



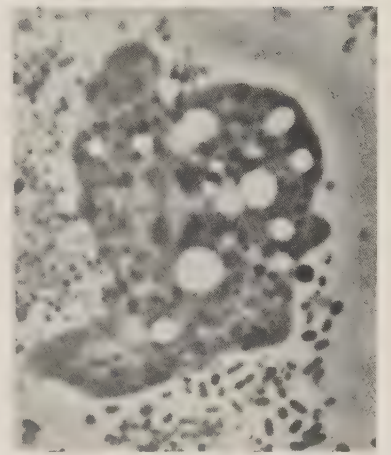
54



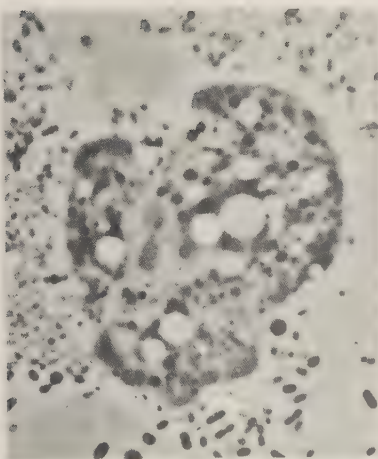
55



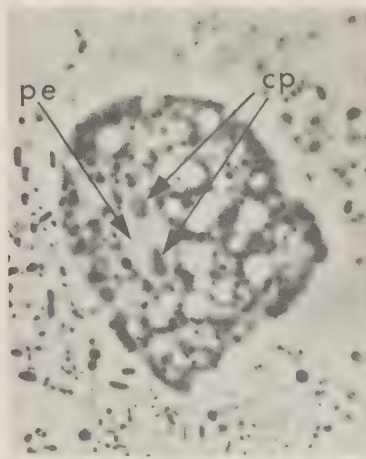
56



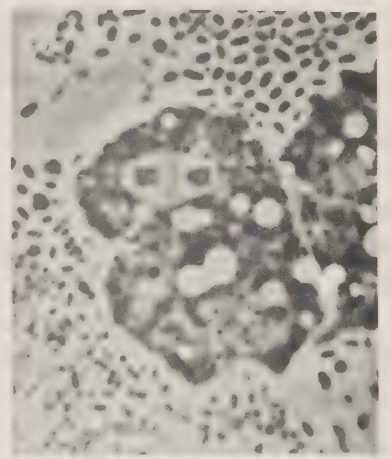
57



58



59



60

Planche VIII. : Souche RH₃a. : Vahkampfia sp.

Planche VIII.

Souche RH₃a. : Vahlkampfla sp.

Photographies n° 61 à n° 70 : Microphotographies prises sur le vivant
en contraste de phase.

Grossissement : x 1.500

■ Photographies n° 61 à n° 63 : Formes végétatives.

■ Photographies n° 64 à n° 67 : Stades prophasiques.

Remarquer l'étirement difficile et souvent asymétrique du nucléole, ainsi que les corps polaires de forme plutôt triangulaire.
(Cf. l'aspect des n°55 à 59 page précédente).

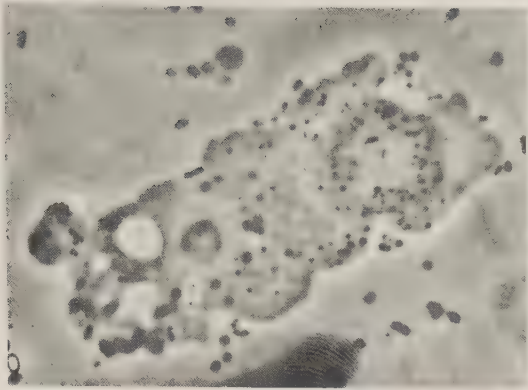
■ Photographies n° 68 & n° 69 : Métaphase.

■ Photographie n° 70 : Anaphase.

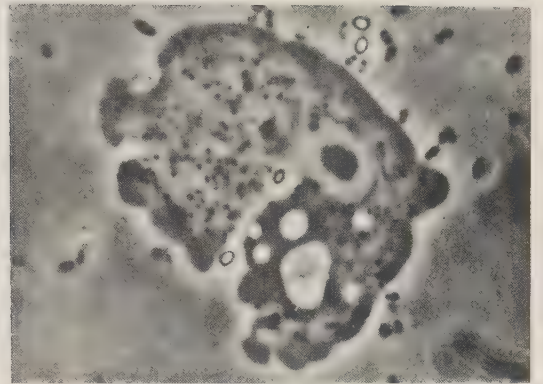
Plaques chromosomiques peu visibles.

Légendes en regard des flèches :

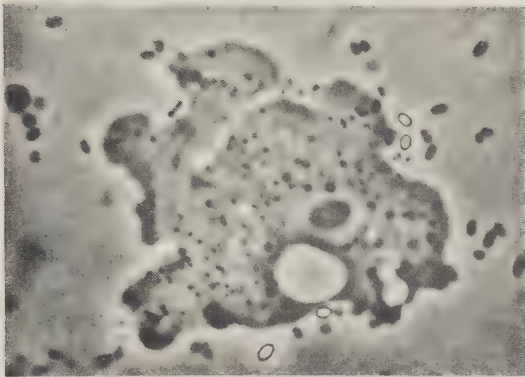
c.f. = chromosomes-fils



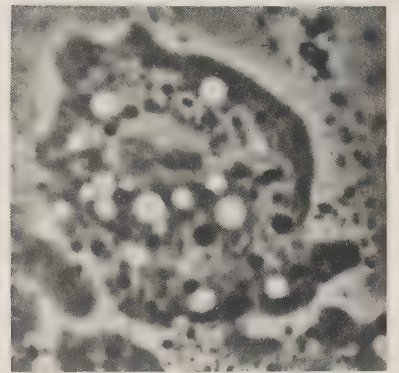
61



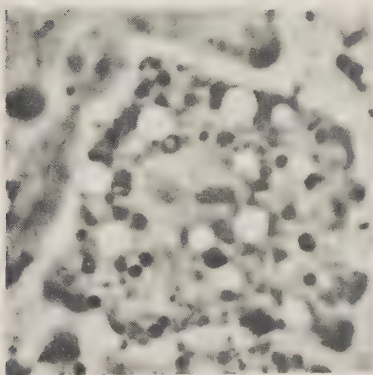
62



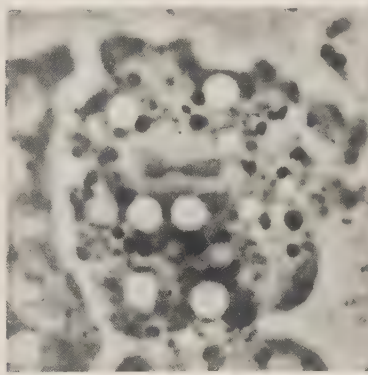
63



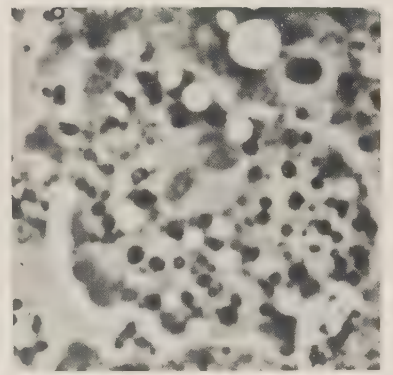
64



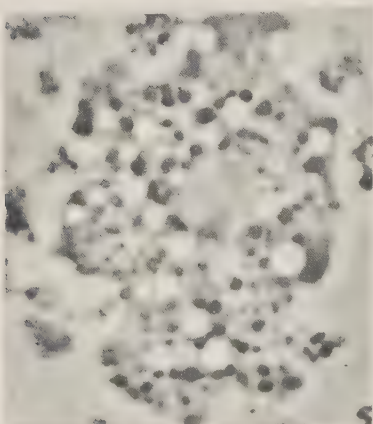
65



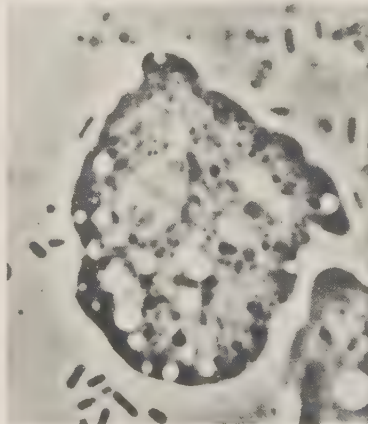
66



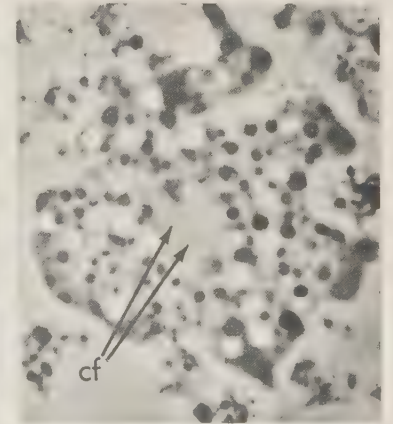
67



68



69



70

Planche IX. : Souche $RH_5b.$: Vahkampfia sp.

Planche IX.

Souche RH₅b. : Vahlkampfia sp.

Photographies n° 71 & n° 72 : Microphotographies prises sur le vivant en contraste de phase "Anoptral".

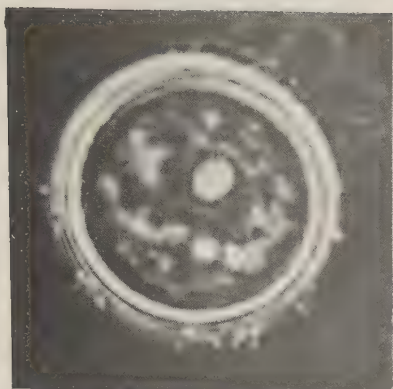
n° 73 à n° 76 : Microphotographies prises sur le vivant en contraste de phase.

Grossissement : x 1.500 (n°71 & n°72) ; x 945 (n°73 & n°76).

■ Photographies n° 71 & n° 72 : Kystes.

■ Photographies n° 73 à n° 76 : Formes végétatives.

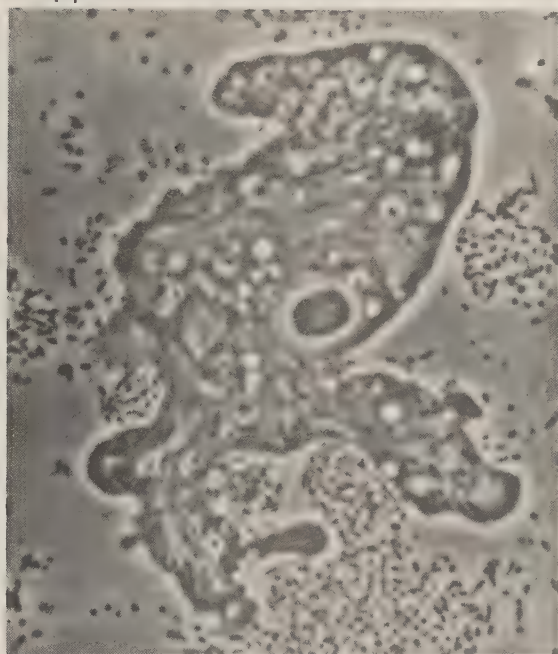
Remarquer les vacuoles contractiles dispersées dans tout le cytoplasme.



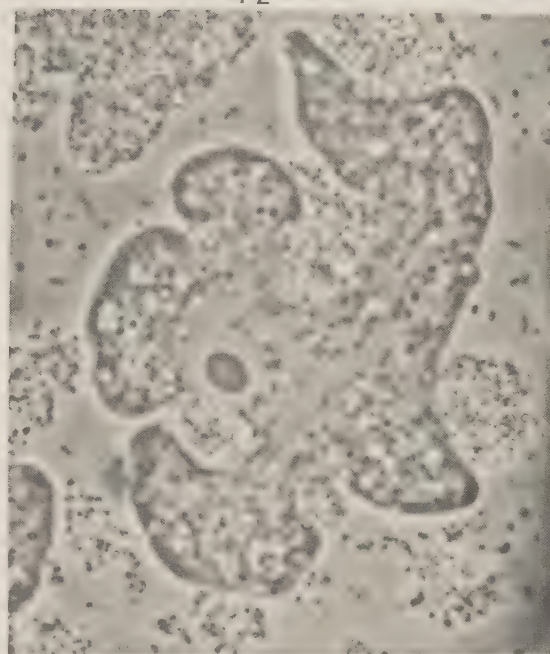
71



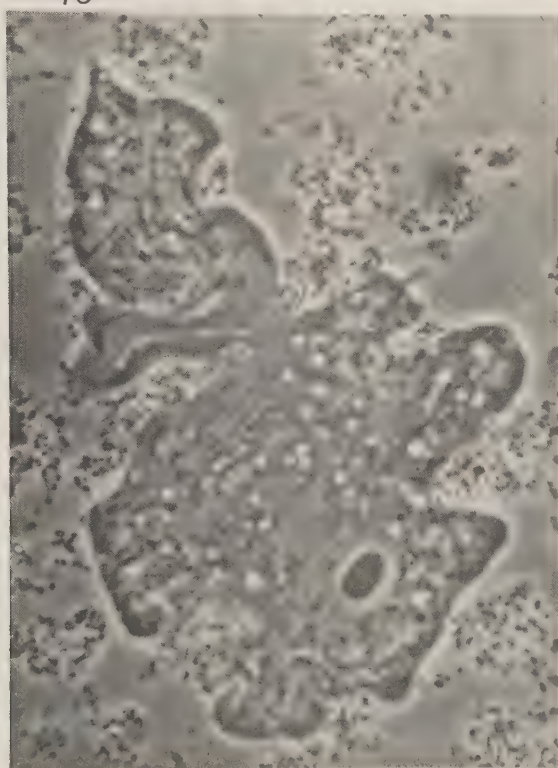
72



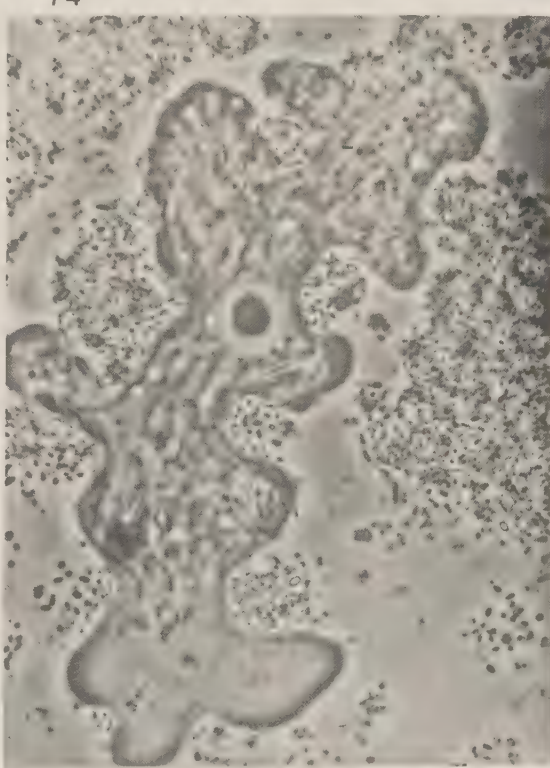
73



74



75



76

Planche X. : Souche RH₅b. : Vahlkampfia sp.

Planche X.

Souche RH₅b. : Vahlkampfia sp.

Photographies n° 77 à n° 84 : Microphotographies prises sur le vivant
en contraste de phase.

Grossissement : x 945 (n°77 à n°80 ; n°82 à n°84) et x 1.500 (n°81).

■ Photographies n° 77 & n° 78 : Stades prophasiques.

Remarquer l'étirement du nucléole par le côté.

■ Photographies n° 79 à n° 81 : Métaphase.

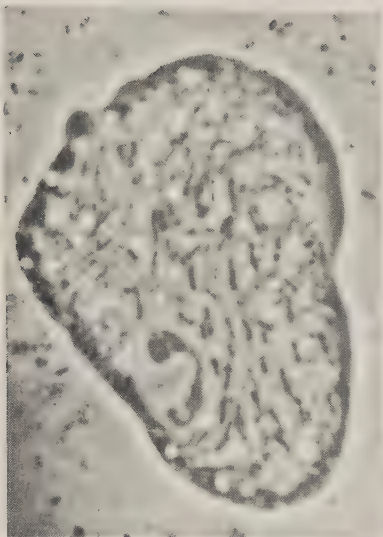
Remarquer l'aspect finement peigné des corps polaires et leur bordure inférieure irrégulière.

■ Photographies n° 82 à n° 84 : Anaphase.

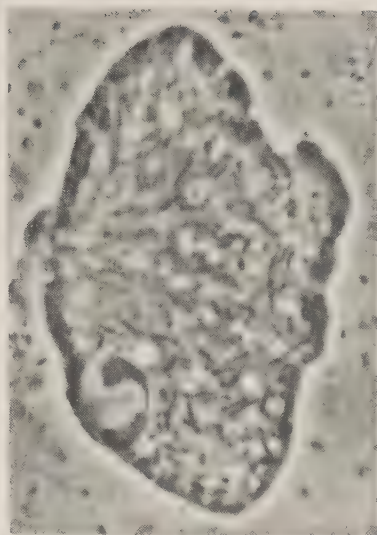
Le matériel chromatinien s'estompe.

Légendes en regard des flèches :

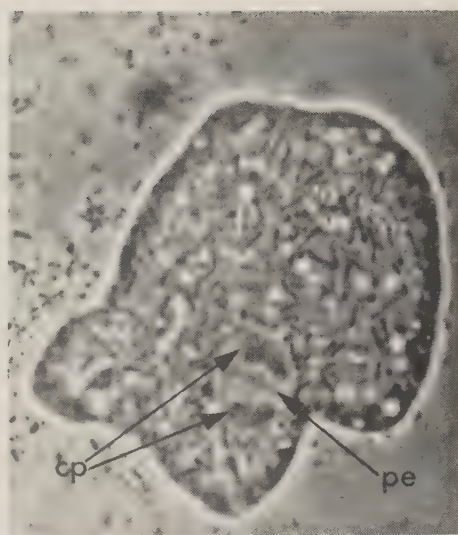
[c.p.] = corps polaires ; [p.é.] = plaque équatoriale



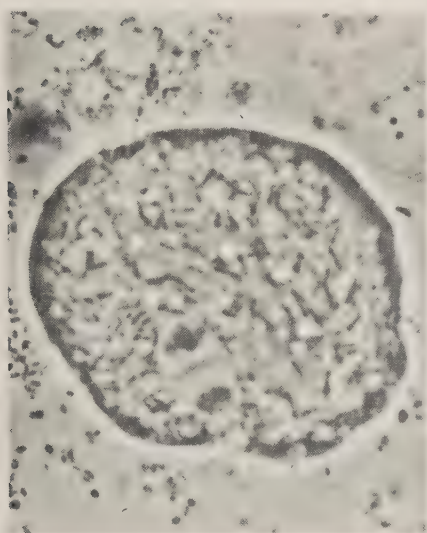
77



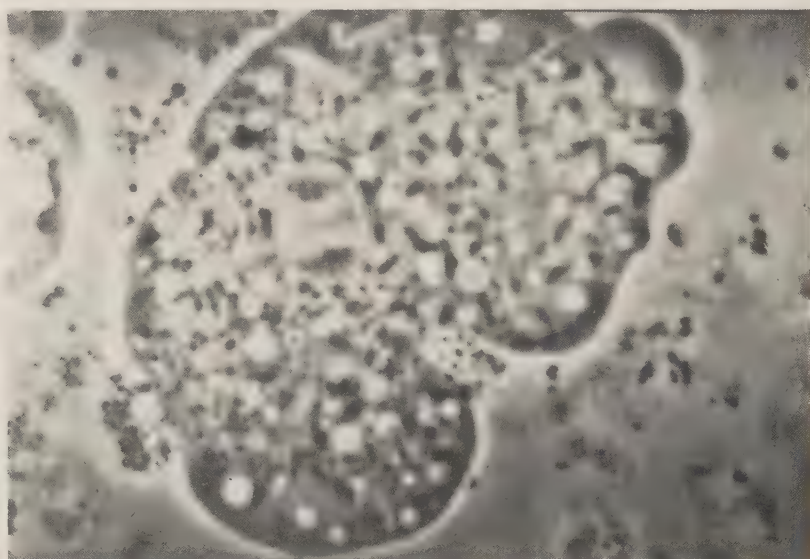
78



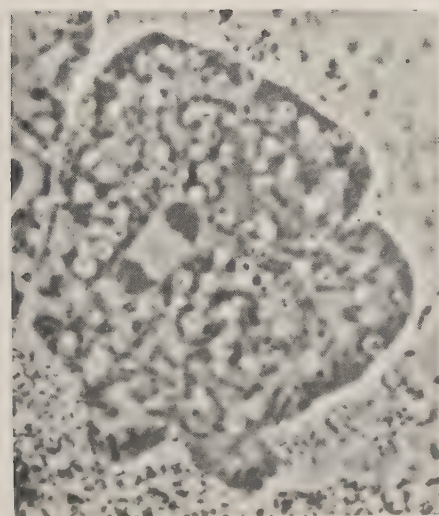
79



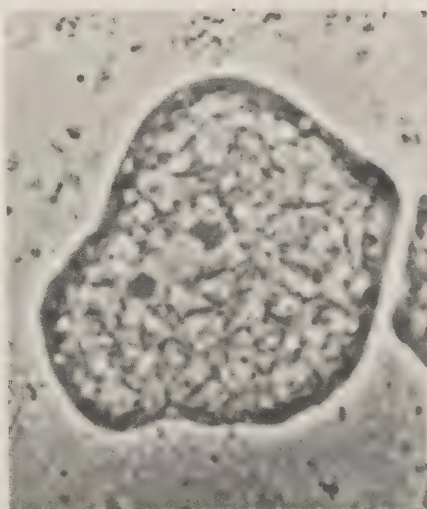
80



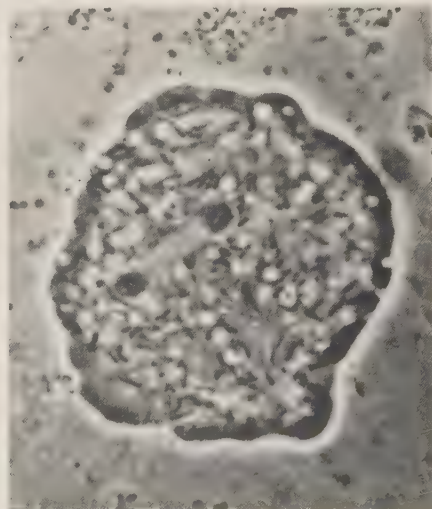
81



82



83



84

Planche XI. : Souche $\text{RH}_5\text{f.}$: Vahlkampfia sp.

Planche XI.

Souche RH₅f. : Vahlkampfia sp.

Photographies n° 85 à n° 96 : Microphotographies prises sur le vivant
en contraste de phase.

Grossissement : x 1.500

■ Photographies n° 85 & n° 86 : Formes végétatives.

■ Photographies n° 87 à n° 92 : Stades prophasiques.

Remarquer l'allongement du nucléole mais l'absence de corps en sablier
(n°87 à n°89) ainsi que sa dissolution quasi totale (n°90 à n°92).

■ Photographie n° 93 : Métaphase.

■ Photographies n° 94 à n° 96 : Début d'anaphase.

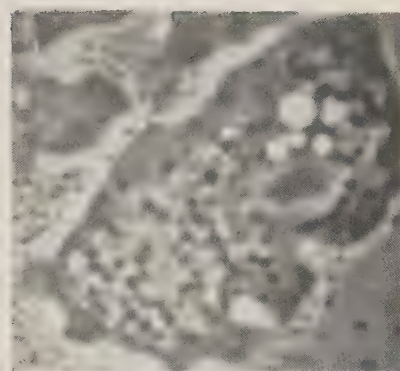
On devine l'apparition de corps polaires.



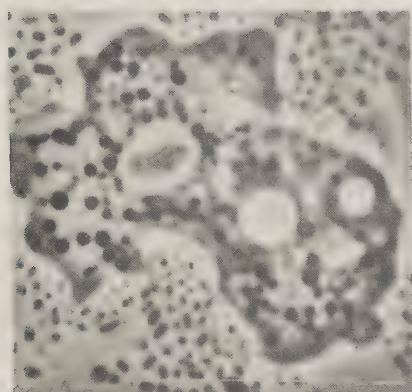
85



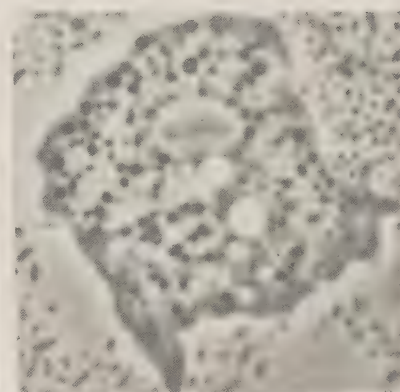
86



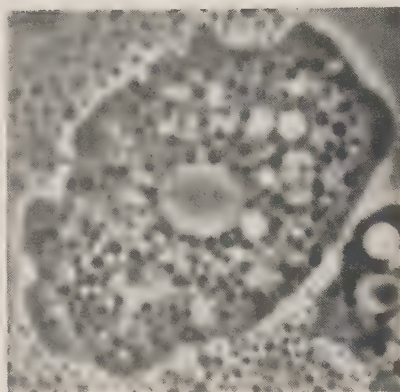
87



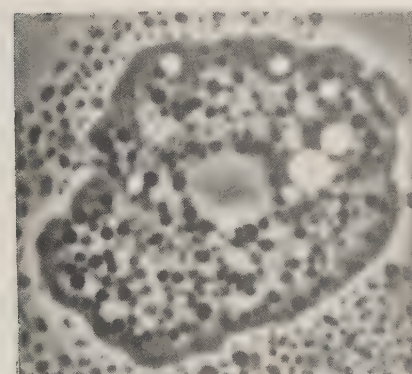
88



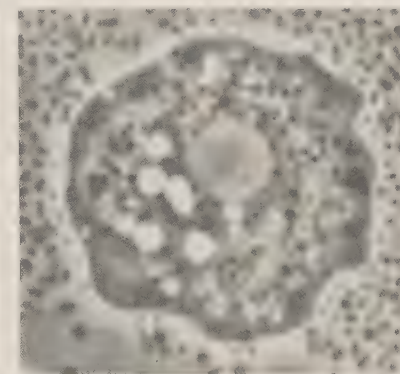
89



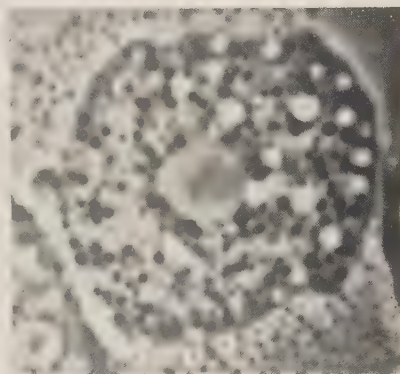
90



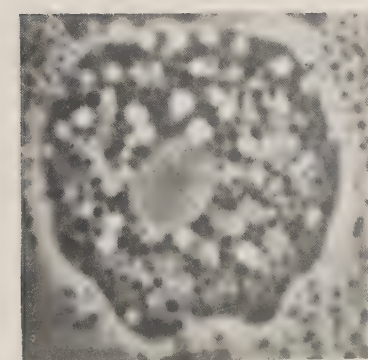
91



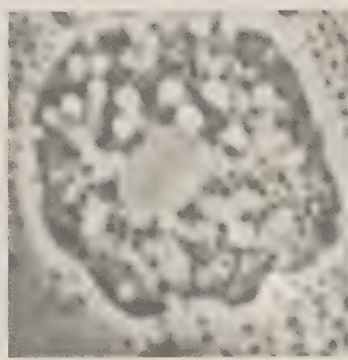
92



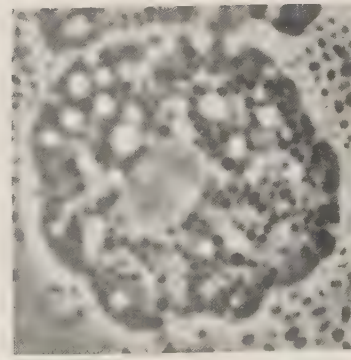
93



94



95



96

Planche XII. : Souche RH₅f. : Vahlkampfia sp.
(suite)

Planche XII.

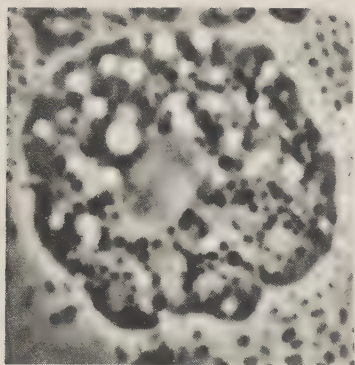
Souche $RH_5f.$ (suite) : *Vahlkampfia* sp.

Photographies n° 97 à n° 100 : Microphotographies prises sur le vivant
en contraste de phase.

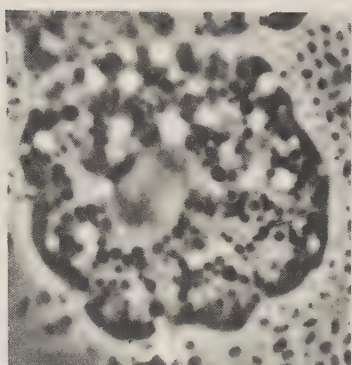
Grossissement : x 1.500

■ Photographies n° 97 à n° 100 : Anaphase.

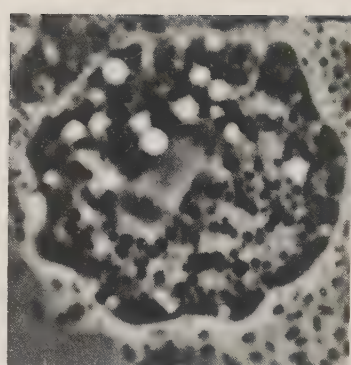
L'apparition des corps polaires se fait de plus en plus nette
au fur et à mesure de leur ascension.



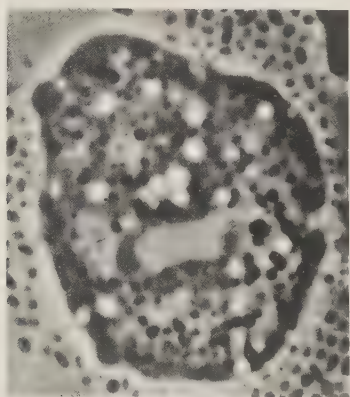
97



98



99



100

Observations de différents Modes mitotiques chez des Amibes de Type " flabellulien ".

Nous avons déjà signalé l'aspect morphologique des souches de type flabellulien et ses caractères peu spécifiques dans la mesure où ils sont retrouvés dans des genres très divers appartenant à plusieurs familles (161).

Nous avons également vu qu'une forte proportion des souches isolées à Lyon appartient à ce type : 19 sur 85. Toutes ces souches n'ont pas encore fait l'objet d'une étude en microculture et, parmi celles qui ont été examinées, le rattachement à un genre ou à une espèce déjà décrits s'avère souvent très délicat.

Notre but sera donc simplement de montrer une nouvelle fois, à partir de nos premières observations, tout l'intérêt présenté par une étude attentive de la mitose. Il nous a en effet été possible de retrouver chez ces amibes de type flabellulien, deux modes mitotiques, - méso et méta mitoses (Pussard stricto sensu) -, avec quelquefois, pour chacun d'eux, des particularités intéressantes que nous nous efforcerons de mettre en évidence.

A. Division par Métamitose

chez des Souches d'Aspect "flabellulien".

La métamitose est le mode de division le plus fréquemment rencontré chez ces amibes. Elle est banale dans la mesure où elle ressemble beaucoup au mode de division des cellules des métazoaires et où elle s'observe très souvent chez les amibes libres. Par certains éléments, elle doit néanmoins être prise en considération lors de l'établissement d'une diagnose.

■ Le début de la division est marqué par l'arrêt de la locomotion : les cellules perdent leur aspect flabellulien pour adopter un contour parfaitement circulaire. La lame ectoplasmique, auparavant bien développée, se trouve réduite à une simple bordure et reste ainsi jusqu'à l'achèvement de la cytodierèse.

■ Au début de la **prophase**, le noyau subit un léger gonflement tandis que le nucléole s'estompe progressivement. Généralement, après la disparition complète du nucléole, le suc nucléaire demeure un instant optiquement vide, limité par la membrane nucléaire (Cf Planche XIII. n°101 p.159). Ce stade du "noyau vide" a déjà été signalé par Houssay et Prenant (101) chez *Thecamoeba sphaeronucleolus*; et par Pussard (179) chez *Pessonnella marginata*, deux amibes d'aspect flabellulien se divisant par méso-mitose. Nos observations prouvent donc qu'on peut également retrouver ce caractère chez des souches flabelluliennes se divisant par métamitose.

■ La membrane nucléaire est encore présente lorsque se forme la plaque équatoriale (Cf Planche XIII. n°102 p.159). Elle disparaît un peu plus tard, au cours de la **métaphase**. La plaque équatoriale, libérée au sein de l'endoplasme, devient alors plus difficilement observable, d'autant qu'apparaît un phénomène cytoplasmique superficiel, qui se déroule parallèlement aux événements nucléaires. Il s'agit du développement d'une multitude de petites boursouflures prenant naissance sur toute la surface cellulaire. Ce phénomène devient surtout net après la disparition complète du nucléole et s'amplifie jusqu'en fin d'anaphase. Il confère un aspect muriforme aux cellules en division et gêne considérablement l'observation microscopique, la rendant parfois impossible (Cf Planche XIII. n°103 p.159). A notre connaissance, seul Pussard a déjà mentionné ce phénomène, lors de l'étude de *Pessonnella marginata* (179). Nous l'avons personnellement retrouvé chez la plupart de nos souches de type flabellulien, en mitose.

■ Cependant, au cours de l'**anaphase**, un examen attentif permet dans la majorité des cas, de suivre l'ascension des plaques chromosomiques, noyées dans l'endoplasme (Cf Planche XIII. n°104 p.159). La séparation des deux plaques de chromosomes-fils s'accompagne d'une ultime systole de la vacuole pulsatile. Elles gagnent ensuite les extrémités opposées de la cellule. A la **télophase** elles échappent alors, peu à peu, à l'observation.

■ En même temps que s'amorce la **cytodiérèse**, les boursouflures cytoplasmiques régressent, la surface de la cellule reprend un aspect plus uniforme. Avant la séparation des deux cellules-filles, des petites vacuoles pulsatiles réapparaissent dans chacune d'entre elles. Les noyaux-fils

ne redeviennent visibles qu'après la séparation complète des deux cellules filles : les membranes, reconstituées, contiennent alors quelques grains nucléolaires qui fusionnent pour redonner l'unique nucléole central (Cf Planche XIII. n°105 p.159).

Les grandes lignes de ce processus mitotique se retrouvent, en fait, chez de nombreuses souches. Néanmoins, chez les amibes de type flabellulien la métamitose peut présenter certaines particularités dont deux ont retenu notre attention : l'apparition d'une couronne prophasique et l'existence possible de centres cinétiques.

■ Apparition d'une Couronne prophasique.

■ Ce phénomène prend place avant l'effacement complet du nucléole : on constate l'apparition d'une couronne, assez floue et irrégulière, entourant cet élément, et conférant au noyau prophasique un aspect "en cible" (Cf Planche XIII. n°106 - n°108 p.159). Ceci ne dure que l'espace de quelques instants.

Nous avons observé ce phénomène chez la souche BR₄a., amibe de type flabellulien, mais nous n'avons pu suivre son évolution avec autant de précision que chez une autre de nos souches (Cf. page 207). Chez BR₄a., la disparition prophasique du nucléole n'est ni annoncée, ni précédée par l'arrêt de la locomotion, les deux phénomènes prenant place simultanément ou presque.

■ Le nucléole, devenu punctiforme, achève sa dissolution alors que la couronne prophasique disparaît également : ainsi se réalise le stade du "noyau vide" (Cf Planche XIII. n°109 - n°111 p. 159).

■ La membrane nucléaire paraît s'effacer, mais l'évolution ultérieure de la mitose reste impossible à préciser en raison de l'importance des protubérances cytoplasmiques qui masquent ensuite totalement les événements nucléaires. Les plaques chromosomiques redeviennent généralement visibles en cours d'anaphase, quand le phénomène cytoplasmique s'atténue (Cf Planche XIV. n°112 p.163).

■ En l'absence de coloration de Feulgen et en raison des difficultés rencontrées à l'occasion de l'examen de BR₄a., il devient malaisé de préciser la nature exacte de la couronne ainsi entrevue. Il sem-

Planche XIII.

Photographies n° 101 à n° 111 : Microphotographies prises sur le vivant en contraste de phase.

Grossissement : x 945 (n°101 - n°105) ; x 1.500 (n°106 - n°111).

■ Photographie n° 101 : Prophase : stade du "noyau vide".

(Souche RH₉b. voir ses formes végétatives Pl.I. n°2 & n°3 p.43).

La flèche indique l'emplacement du "noyau vide".

■ Photographie n° 102 : Métaphase (souche RH₉b.)

La flèche repère le noyau.

Remarquer la plaque équatoriale.

■ Photographie n° 103 : Aspect superficiel muriforme de la cellule pendant la division (souche RH₉b.).

■ Photographie n° 104 : Anaphase (souche RH₉b.)

On distingue les deux plaques de chromosomes-fils.

■ Photographie n° 105 : Reconstitution d'un des deux noyaux-fils après séparation des deux cellules-filles (souche RH₉b.)

Remarquer l'apparition de trois petits grains nucléolaires qui fusionnent par la suite, en redonnant l'unique nucléole central.

■ Photographies n° 106 à n° 108 : Stades prophasiques (souche BR₄a.)

Dissolution du nucléole, qui devient punctiforme, et apparition d'une couronne autour : stade fugace du "noyau-cible" (n°108).

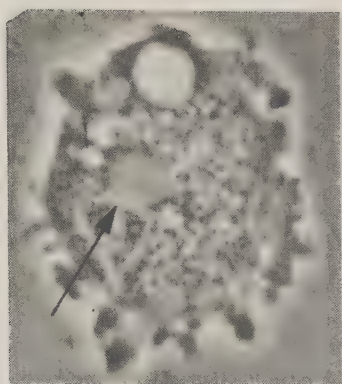
■ Photographies n° 109 à n° 111 : Stades prophasiques (souche BR₄a.)

Achèvement de la disparition du nucléole et redissolution de l'anneau prophasique : on aboutit au "noyau vide" (n°111).

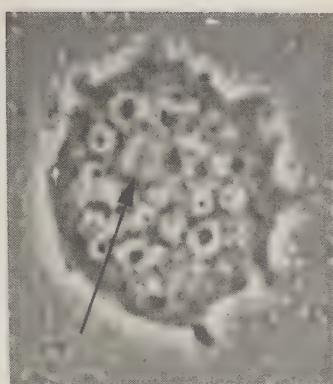
Légendes en regard des flèches :

[c.f.] = chromosomes-fils ; [c.p.] = couronne prophasique ;

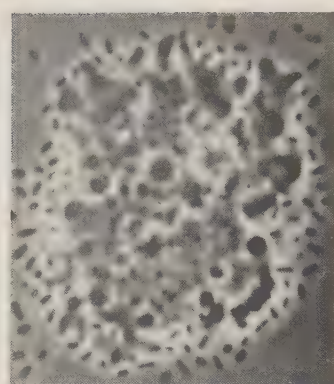
[nl.d.] = nucléole en dissolution



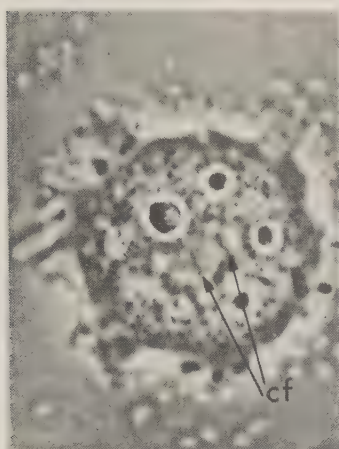
101



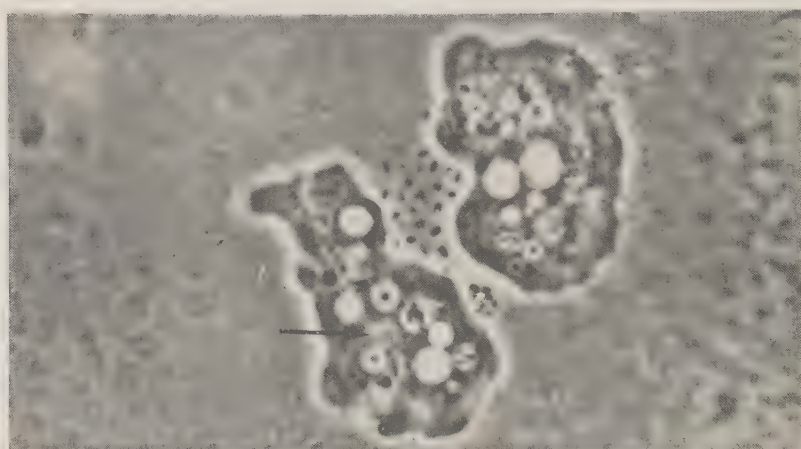
102



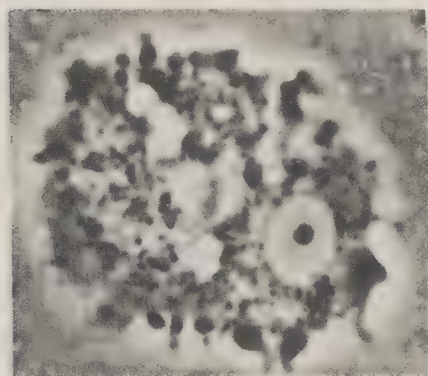
103



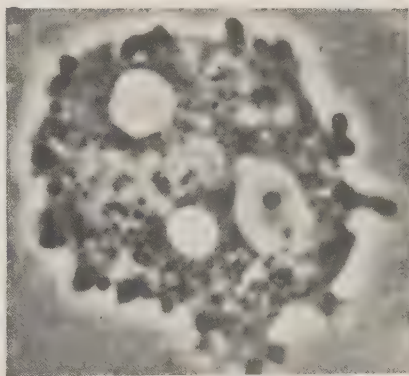
104



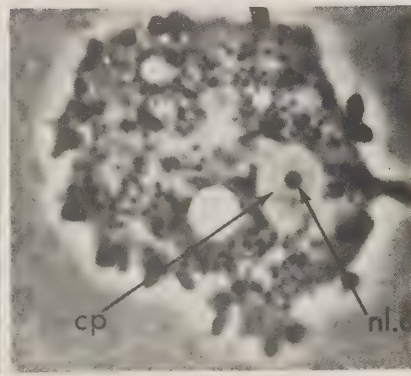
105



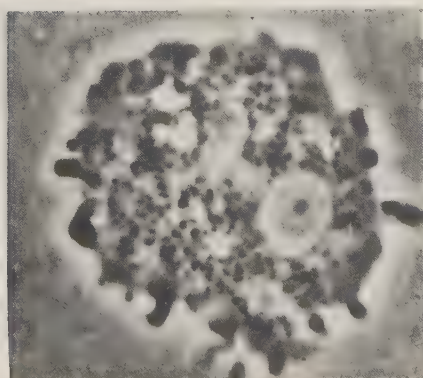
106



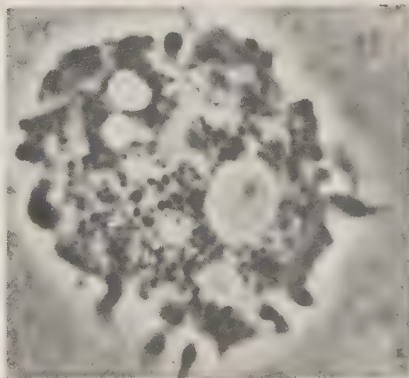
107



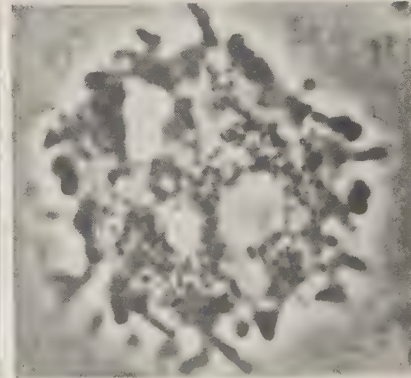
108



109



110



111

ble cependant, dans ce cas, qu'il s'agisse plus d'un phénomène de recondensation provisoire du nucléole précédant sa dissolution définitive, que d'une couronne d'origine chromatinienne, comparable à celle que nous avons observée chez *Comandonia operculata*.

■ Existence de Centres cinétiques.

Nous avons été amené à nous demander si, chez une amibe de type flabellulien identifiée, d'après ses caractères morphologiques, à *Platyamoeba stenopodia* Page 1969 (Cf Planche XIV. n°113 & n°114 p.163), la présence de formations polaires observées en cours de mitose ne correspondait pas, en fait, à l'existence de centres cinétiques.

■ Après une perte de polarisation, la **prophase** est caractérisée par la dissolution complète du nucléole et par la disparition précoce de la membrane nucléaire (Cf Planche XIV. n°115 & n°116 p.163). Peu de temps après, on remarque, à chaque extrémité de l'emplacement du noyau, avant même que se forme la plaque équatoriale, deux lignes sombres, délicates, le plus souvent rectilignes, ou parfois légèrement incurvées "en accent circonflexe" (Cf Planche XIV. n°117 p.163).

■ Au cours de la **métaphase** ces deux plaques polaires deviennent bien distinctes, et se discernent même mieux que la plaque équatoriale qui reste moins marquée (Cf Planche XIV. n°118 & n°119 p.163).

■ L'**anaphase**, après scission de la plaque équatoriale, permet de suivre la montée, vers chaque extrémité de la cellule, de deux doublets de lignes parallèles. Chacun de ces doublets est donc constitué d'une "plaque polaire" et d'une plaque chromosomique, cette dernière apparaissant de plus en plus dense au cours de l'étirement du noyau. Le début de l'anaphase est suivi de l'arrêt du fonctionnement de la vacuole pulsatile (Cf Planche XIV. n°120 - n°123 p.163).

■ L'observation de la **télophase** conduit à deux remarques essentielles : à aucun moment il n'est vu de fusion des deux plaques constituant le doublet, même à la fin de la télophase celles-ci restent nette-

Planche XIV.

Photographies n° 112 à n° 125 : Microphotographies prises sur le vivant en contraste de phase.

Grossissement : x 1.500

■ Photographie n° 112 : Anaphase (souche BR₄a.)

Les plaques chromosomiques redeviennent visibles en cours d'anaphase.

■ Photographies n° 113 & n° 114 : *Platyamoeba stenopodia*.

Formes végétatives.

Remarquer la lame ectoplasmique bien développée qui occupe à peu près la moitié de la cellule.

■ Photographies n° 115 & n° 116 : Stades prophasiques : disparition du nucléole.

La flèche indique l'emplacement du noyau.

■ Photographies n° 117 - n° 119 : Métaphase

■ Photographies n° 120 - n° 123 : Anaphase

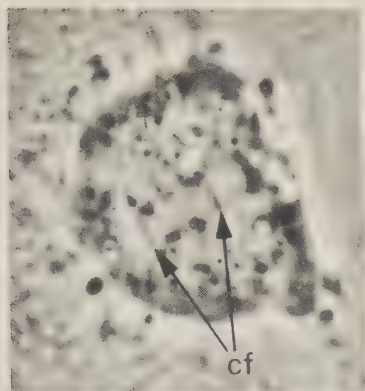
■ Photographies n° 124 & n° 125 : Télaphase et Cytodiérèse.

L'apparition des vacuoles pulsatiles se produit dans l'étroit espace qui sépare les 2 lignes parallèles de chacun des doublets (n°125), c'est-à-dire entre la formation polaire et la plaque des chromosomes-fils.

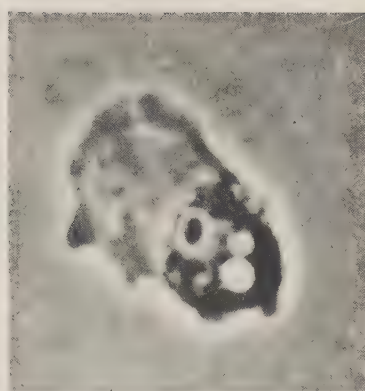
Légendes en regard des flèches :

[c.f.] = chromosomes-fils ; [p.é.] = plaque équatoriale.

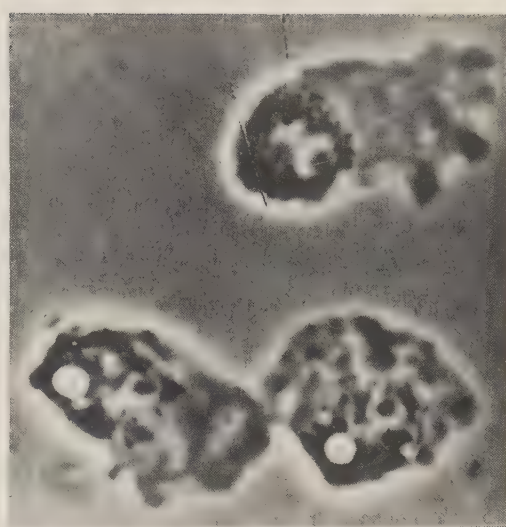
Remarque : la présence du matériel chromatinien est indiquée par les grandes flèches, alors que les structures polaires sont repérées par les petites flèches.



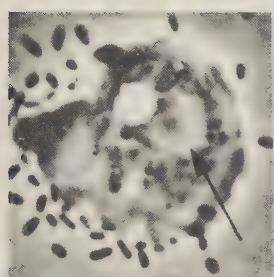
112



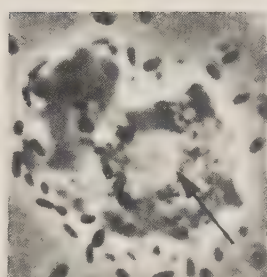
113



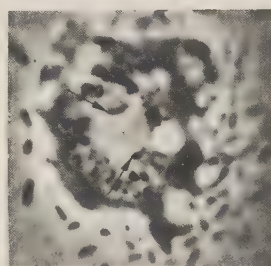
114



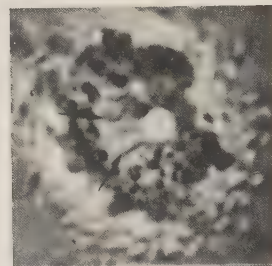
115



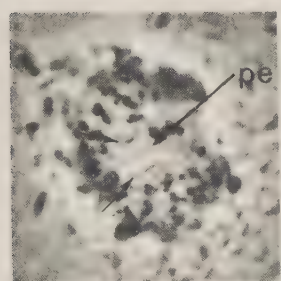
116



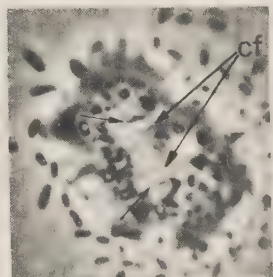
117



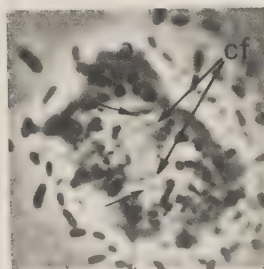
118



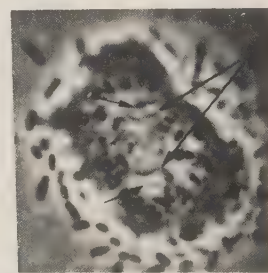
119



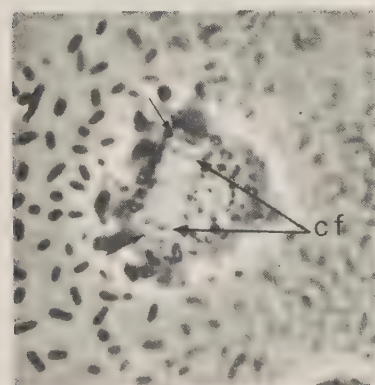
120



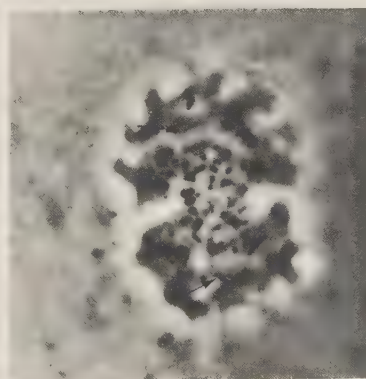
121



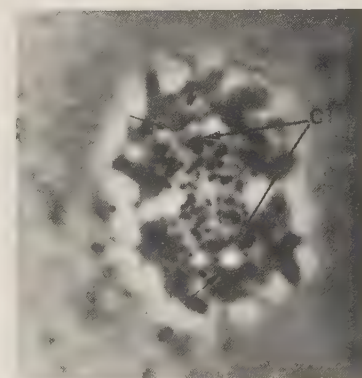
122



123



124



125

ment dissociées (Cf Planche XIV. n°124 & n°125 p.163). Ce fait diffère de ce que nous avons pu observer chez d'autres souches caractérisées par l'apparition de formations en calottes polaires, comme *Vannella* sp. et *Nuclearia simplex*. D'autre part, les vacuoles pulsatiles réapparaissent toujours pendant la cytodierèse, dans l'espace étroit compris entre les deux lignes parallèles de chaque doublet. Ce phénomène ne manque pas de rappeler les observations de Pussard chez *Acanthamoeba*, sur le rôle inducteur de la "centrosphère" dans la formation du plasma pulsatile (171, 172, 175).

Ces deux constatations nous incitent à assimiler les structures polaires de cette souche à un équivalent centriolaire, plutôt qu'à des formations comparables à celles que nous avons observées chez *Vannella* sp. ou chez *Nuclearia simplex* et qui sont, vraisemblablement, dans ces deux cas d'origine nucléolaire.

■ La plaque chromosomique, et la plaque polaire qui la surmonte, demeurent visibles tout au long de la télophase et même un instant après la séparation des cellules-filles, puis elles finissent par échapper à l'observation. Les chromosomes-fils retournent à un état dispersé, alors que la formation polaire est également perdue de vue, se confondant facilement, du fait de sa petite taille, avec les autres inclusions par suite de la reprise des mouvements de cyclose de l'endoplasme : la moyenne des dimensions des formes végétatives de *Platyamoeba* sp. ne dépasse pas 20 μ m.

■ Nous signalons enfin que Page (145, 148) n'a pas mentionné l'existence de ce phénomène dans l'étude de *Platyamoeba placida* et *Platyamoeba stenopodia*. Il s'agit là de deux nouvelles espèces. La dernière paraît très proche de notre souche par ses caractères morphologiques et par la formation de kystes. Par contre, cet auteur signale (151, 158) l'existence de calottes polaires persistant jusqu'à la métaphase chez *P. flabellata*, et même jusqu'à l'anaphase chez *P. mainensis*, qui sont deux espèces d'origine marine. Page considère qu'il s'agit là d'un restant de membrane nucléaire. Cette interprétation nous paraît difficile à admettre en raison de la persistance tardive du phénomène.

Une telle souche demanderait à être étudiée en microscopie électronique pour essayer d'élucider la nature de ces formations.

B. Division par Mésomitose

chez des Souches d'Aspect "flabellulien".

Chez 3 de nos souches, CH₃, BR₅b., VE₁b., de diverses origines mais ne différant que par la taille, nous avons observé ce mode de division au sens précis que Pussard confère à ce terme. Cependant, dans ces cas, un caractère particulier à la mésomitose a retenu notre attention : l'apparition de "calottes polaires" très distinctes en fin d'anaphase.

■ Les formes végétatives de nos souches présentent un aspect flabellulien typique, avec deux régions nettement différenciées.

■ L'ectoplasme constitue à l'avant de la cellule, une lame d'importance variable suivant l'épaisseur du film liquidien où l'amibe évolue. Dans un film liquidien relativement important, la lame ectoplasmique se déploie largement en éventail vers l'avant, tandis que l'endoplasme se trouve complètement rejeté à l'arrière de la cellule. Celle-ci adopte alors fréquemment un contour spatulé (Cf Planche XV. n°126 & n°127 p.171). Le déploiement du voile ectoplasmique est un peu moindre quand l'épaisseur du film liquidien diminue et que l'amibe s'étale sur le substrat (Cf Planche XV. n°128 - n°131 p.171).

■ L'endoplasme renferme un noyau avec une membrane bien marquée, ainsi que des vacuoles pulsatiles proéminentes. Généralement au nombre de 2 ou 3, elles prennent naissance et se développent sur le pourtour du noyau, si bien que celui-ci apparaît parfois cerné et séparé du reste de l'endoplasme (Cf Planche XV. n°128 & n°129 p.171). Le contour de ces vacuoles, très irrégulier au début, s'arrondit avant chaque systole.

■ Enfin, on observe fréquemment un phénomène qui ne pourrait se traduire qu'à l'occasion d'un enregistrement cinématographique. Dans l'endoplasme, certaines vacuoles, ne renfermant en principe qu'une seule proie bactérienne, sont soumises à un mouvement de rotation sur elles-mêmes. Il ne nous est pas encore possible, en l'état actuel de nos observations, de préciser si ce mécanisme, qui entraîne à la fois la vacuole et sa proie, est en rapport avec la digestion. Le tournoiement, parfois excessivement rapide, peut atteindre une durée de l'ordre d'une minute. Jusqu'à présent, ce phénomène n'a été observé que chez nos 3 souches ci-

tées : CH_3 , $\text{BR}_5\text{b.}$, et $\text{VE}_1\text{b.}$

■ La mitose est également très caractéristique.

■ Les stades prophasiques sont difficiles à repérer et à fixer sur la pellicule, en raison de leur évolution rapide. En même temps que cessent les déplacements, le nucléole subit une dissolution très lâche (Cf Planche XV. n°132 p.171). Il semble cependant, d'après certaines observations réalisées à ce stade, qu'une petite partie du matériel nucléolaire persiste et se redistribue, dès cette étape, le long de la membrane nucléaire, en particulier aux futurs pôles du noyau. La plaque équatoriale s'organise dès la prométaphase, simultanément à l'évolution du nucléole : le matériel chromatinien se prête particulièrement bien à l'observation microscopique.

■ A la métaphase la membrane nucléaire est toujours nettement distincte. Selon le cas, le dépôt probablement d'origine nucléolaire demeure visible, ou n'est plus représenté que par un fin liséré à peine perceptible, bordant la membrane nucléaire aux pôles du noyau (Cf Planche XV. n°133 & n°134 p.171).

■ La persistance de la membrane nucléaire au cours de l'anaphase ne fait aucun doute, puisque le début de l'ascension des chromosomes-fils s'effectue au sein du suc nucléaire hyalin et homogène. Sa présence est également confirmée sur certaines observations où les plaques chromosomiques sont plus courtes que le diamètre du cercle dessiné par le noyau (Cf Planche XV. n°135 & n°136 p.171). Ces images évoquent le stade de "l'anaphase non déformante" décrit par Pussard chez *Pessonnella marginata* (179).

D'autre part, au cours de l'anaphase, les vacuoles pulsatiles suspendent leur activité, tandis qu'au fur et à mesure de l'étirement du noyau, on assiste à une accentuation très nette des lisérés, qui s'épaississent aux deux pôles, en calottes polaires désormais bien distinctes au cours de cette étape (Cf Planche XV. n°137 - n°139 p.171).

A la fin de l'anaphase, le noyau, très étiré, subit une constriction médiane sans doute suivie d'une rupture de la membrane nucléaire à ce niveau. Simultanément, au cours de l'ascension, les plaques chromosomiques se rapprochent des calottes polaires, et fusionnent finalement avec elles à chaque extrémité du noyau, donnant ainsi naissance à deux

masses sombres importantes (Cf Planche XVI. n°140 - n°142 p.175). Celles-ci migrent vers deux points diamétralement opposés de la cellule, et se trouvent bientôt libérées au sein de l'endoplasme du fait de la rupture de la membrane nucléaire (Cf Planche XVI. n°143 p.175).

■ Au cours de la télophase, après avoir atteint un éloignement maximum, ces formations apicales s'estompent peu à peu et leur évolution ultérieure échappe définitivement à l'observation (Cf Planche XVI. n°144 p.175).

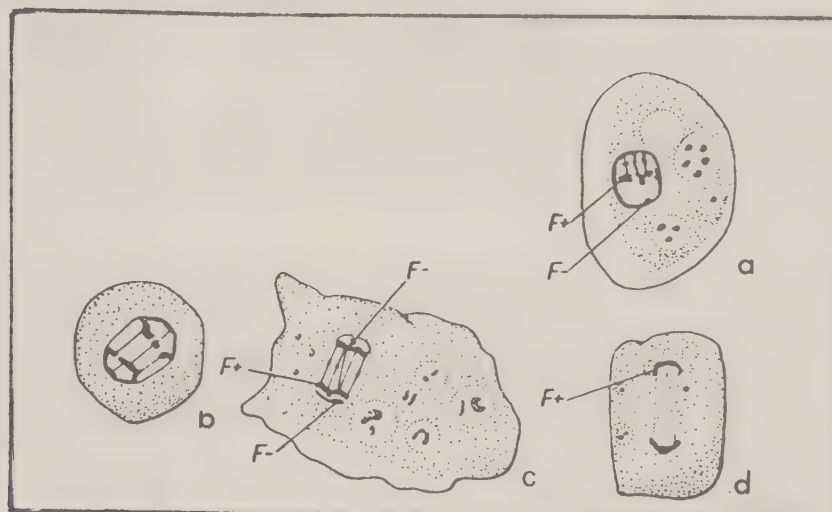
La reconstitution des noyaux-fils prend place avant l'achèvement de la cytodierèse et s'observe grâce à l'apparition de petits grains nucléolaires, qui fusionneront après la séparation des cellules-filles pour redonner l'unique nucléole central. Les vacuoles pulsatiles réapparaissent également en cours de cytodierèse, à proximité des noyaux-fils (Cf Planche XVI. n°145 - n°149 p.175).

■ La persistance de la membrane nucléaire à l'anaphase rattache donc ce type de division au mode mésomitotique (Pussard *stricto sensu*). En raison de l'aspect présenté à ce stade, nous proposons l'expression de "mésomitose à calottes polaires" pour en souligner l'originalité. Cette division évoque suffisamment les observations de Page (145) sur *Vannella platypodia*, pour que nous rattachions nos 3 souches au genre *Vannella* sp.

Ce genre a été créé par Bovee en 1965 (22), pour des amibes de type flabellulien qui se distinguent du genre *Flabellula* Schaeffer 1926 par trois caractères importants : le voile ectoplasmique n'émet pas de pseudopodes, ne présente jamais de fentes, et l'extrémité postérieure est dépourvue de filaments uroïdaux.

Page (148,152) reconnaît le bien-fondé de la séparation de ces deux genres, et complète les distinctions établies par Bovee en signalant une mitose de type particulier. Cet auteur contrôle en effet la persistance de la membrane nucléaire à la métaphase et pendant une partie de l'anaphase. Il note d'autre part, l'existence de matériel Feulgen négatif appliqué contre la membrane nucléaire aux deux pôles du noyau, pendant l'anaphase (Cf Figure 4. page suivante).

Figure 4. Mitose de *Vannella platypodia* d'après Page.
(In : Journal of Protozoology, 1968, 15 : p.10)



a. Prométaphase ; b. Anaphase ; c. Fin d'anaphase ;
d. Début de télophase.

Nous pensons donc avoir retrouvé chez nos 3 souches CH₃., BR₅b. et VE₁b., le même mode de division que celui décrit par Page (145) chez *Vannella platypodia* et *Vannella mira*. Nous espérons en apporter pour la première fois une illustration photographique, à l'appui des dessins réalisés par cet auteur.

■ A partir des conclusions de Bovee, de Page, et de nos propres observations, nous proposons la diagnose suivante pour le genre **Vannella.**

Amibes de type flabellulien.

- ★ Lame ectoplasmique en éventail, bien développée, ne formant pas de pseudopodes individualisés.
- ★ Absence de filaments uroïdaux.
- ★ Noyau vésiculeux, à nucléole central et membrane bien marquée.
- ★ Vacuoles contractiles proéminentes, se formant à proximité du noyau.
- ★ Forme générale volontiers spatulée dans un film liquidien important.
- ★ Division par mésomitose, Pussard stricto sensu, avec présence de calottes polaires bien visibles à l'anaphase.
- ★ Formes flottantes radiées.
- ★ Absence d'enkystement.

Planche XV.

Souche CH ₃ : Vannella sp.

Photographies n°126 à n°139 : Microphotographies prises sur le vivant en contraste de phase.

Grossissement : x 1.500

■ Photographies n°126 & n°127 : Formes végétatives.

Aspect flabellulien dans un film liquidien important.

■ Photographies n°128 à n°131 : Formes végétatives étalées sur le substrat

Remarquer la vacuole pulsatile proéminente, qui entoure le noyau.

■ Photographie n°132 : Stade prophasique. Dissolution du nucléole.

■ Photographies n°133 & n°134 : Prométaphase.

La plaque équatoriale est particulièrement distincte à l'intérieur du noyau encore limité par la membrane nucléaire.

■ Photographies n°135 & n°136 : Stade de "l'anaphase non déformante".

Remarquer les calottes polaires déjà bien visibles n°135.

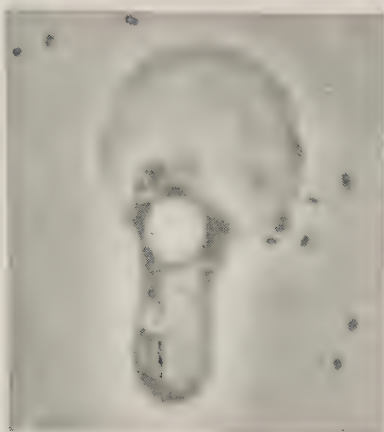
■ Photographies n°137 à n°139 : Anaphase déformante.

Les calottes polaires s'épaississent et deviennent très nettes.

Légendes en regard des flèches :

[v.p.] vacuole pulsatile ; [p.é.] plaque équatoriale ; (n.) noyau ;

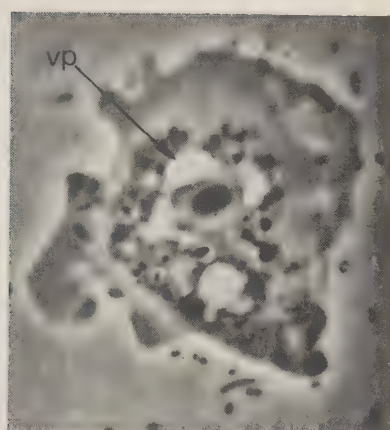
[c.f.] chromosomes-fils ; [c.p.] calottes polaires



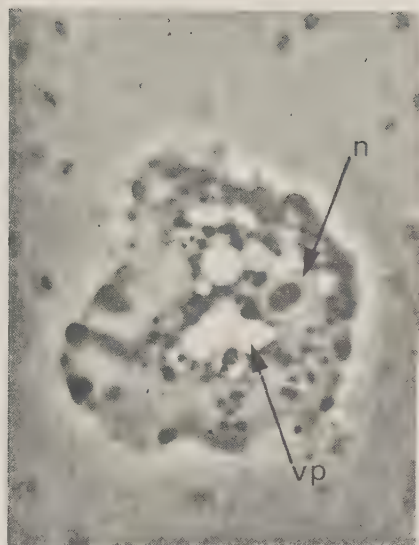
126



127



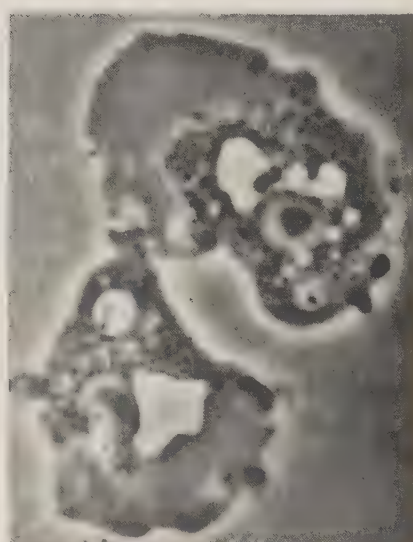
128



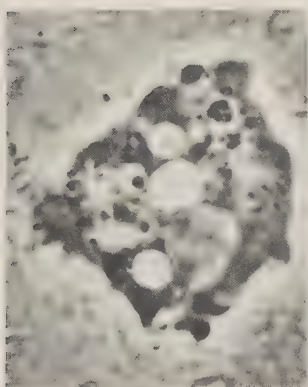
129



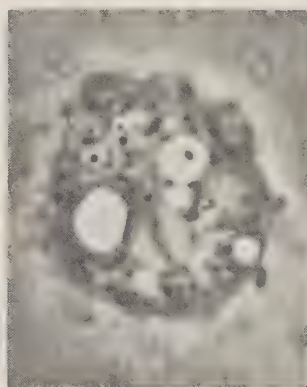
130



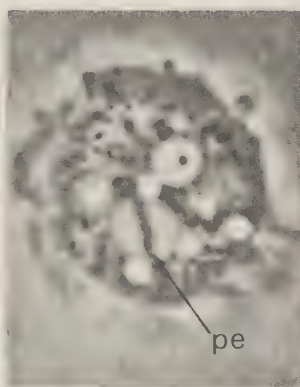
131



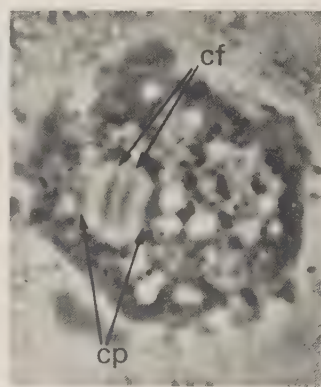
132



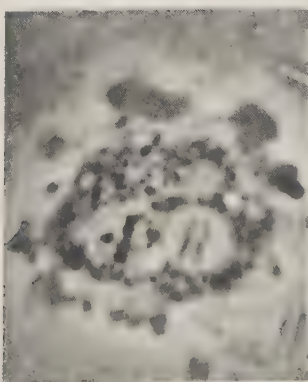
133



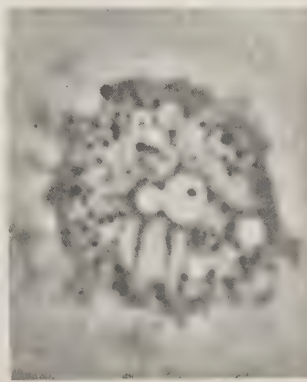
134



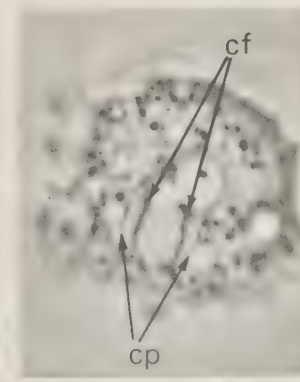
135



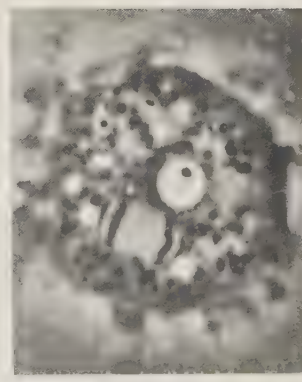
136



137



138



139

Planche XVI. : Souche CH_3 : Vannella sp.

(suite de la Planche XV.)

Planche XVI.

Souche CH ₃ : Vannella sp.

Photographies n°140 à n°149 : Microphotographies prises sur le vivant en contraste de phase.

Grossissement : x 1.500

■ Photographies n°140 à n°142 : Anaphase déformante.

Remarquer la fusion des plaques chromosomiques avec les calottes polaires.

■ Photographies n°143 & n°144 : Fin d'anaphase (n°143)
et début de Télaphase (n°144)

Les deux masses sombres indiquées par les flèches, résultant de la fusion précédente, s'écartent au maximum (n°143), puis échappent à l'observation (n°144).

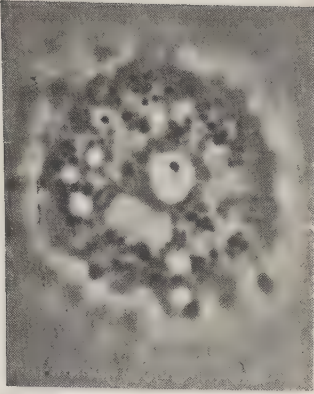
■ Photographies n°145 à n°149 : Télaphase et cytotédiérèse.

La réapparition des noyaux-fils s'effectue avant la fin de la cytotédiérèse, les grains nucléolaires fusionnent par la suite pour redonner le nucléole central.

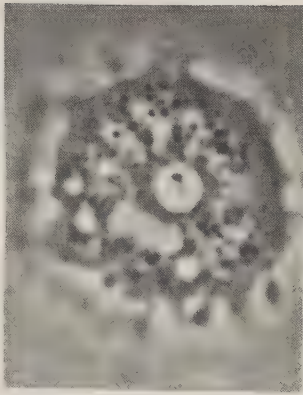
Remarquer la perte accidentelle d'un petit fragment cytoplasmique anucléé au cours de la cytotédiérèse.

Légendes en regard des flèches :

(n.f.) = noyaux-fils



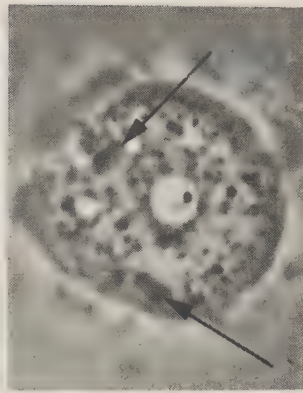
140



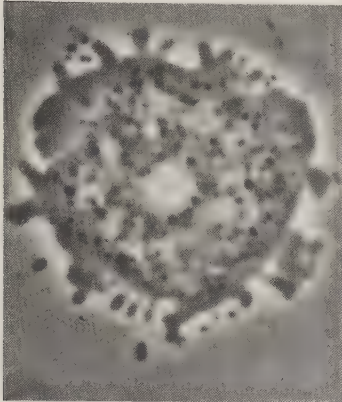
141



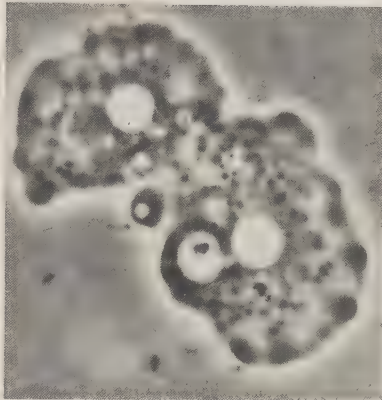
142



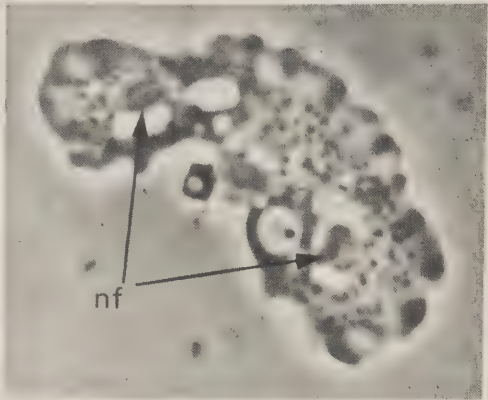
143



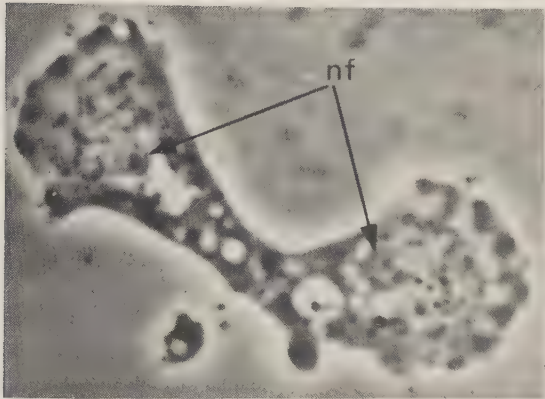
144



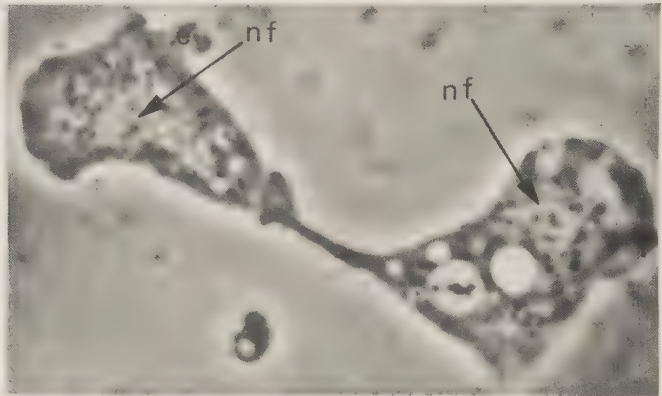
145



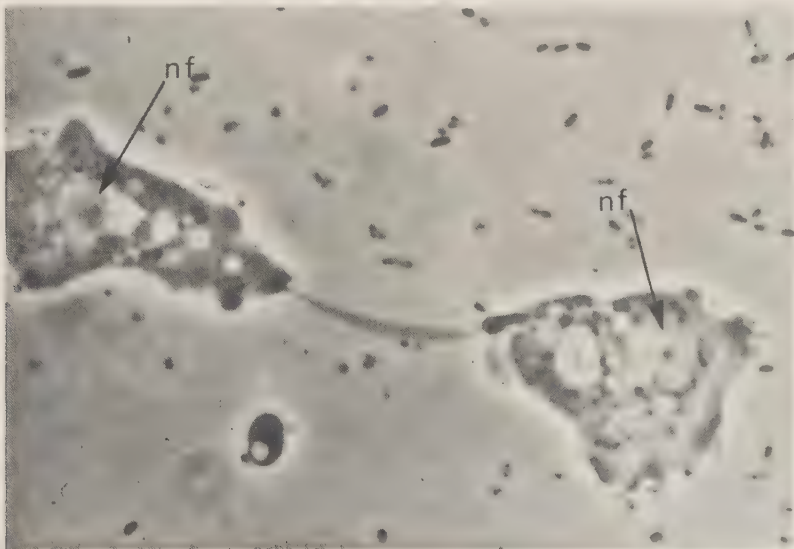
146



147



148



149

■ Ces quelques exemples suffisent à démontrer les caractéristiques particulières, ainsi que la diversité, des modes mitotiques rencontrés au sein d'un groupe d'amibes morphologiquement assez proches qui, si l'on admet la classification de Page (161), se rattacheraient toutes à la famille des Thecamoebidae.

On ne peut que déplorer une simplification excessive, qui tend à restreindre l'importance du phénomène de la mitose chez les amibes, et à ne considérer que l'existence de deux modes mitotiques chez ces protozoaires d'après le seul comportement du nucléole, présent ou non au cours de l'évolution. Dans cette perspective, la mitose perd beaucoup de son intérêt car elle est étudiée de manière trop rapide.

Ces quelques observations, ainsi que celles réalisées précédemment sur le genre *Vahlkampfia*, montrent, à l'évidence, que bien d'autres éléments sont susceptibles de retenir l'attention au cours de la division de ces cellules. Elles permettent une nouvelle fois, de souligner tout l'intérêt qu'apporterait, à l'identification et à la classification des amibes, une étude attentive de la mitose sur le vivant.

Observations d'une Amibe du Genre *Vexillifera* sp. (Paramoebidae).

Lorsqu'en 1926, Schaeffer crée la famille des Mayorellidae, il réserve le genre *Vexillifera* à des amibes qui émettent à leur extrémité antérieure, des pseudopodes longs et grêles pendant la reptation. Pour Bovee (24) les pseudopodes de ce genre sont en outre dépourvus de granulations, et animés de mouvements d'oscillations seulement au moment de leur rétraction, ce qui, selon lui, les oppose à ceux des genres *Oscillosignum* et *Subulamoeba*. Ce même auteur décrit l'existence d'une espèce marine, *Vexillifera telmathalassa* (20), alors que Page (147) crée une nouvelle espèce isolée de l'eau douce, *V. bacillipedes*, et donne pour la première fois une description de la mitose chez ce genre.

Par la suite, Page (154) décide de rattacher la famille des Mayorellidae Schaeffer 1926 à celle des Paramoebidae Poche 1913 en raison des profondes ressemblances qui existent entre les différents genres de ces deux familles. Les deux noms, selon lui, sont synonymes, mais le terme de Paramoebidae prévaut sur celui de Mayorellidae en raison de la règle de priorité. Les genres de la famille des Mayorellidae, - entre autres *Vexillifera* -, sont donc transposés d'après la classification de Page (161), dans la famille des Paramoebidae.

Nous rattachons ici une de nos souches, CH₂a., au genre *Vexillifera* en apportant, pour la première fois à notre connaissance, une étude microphotographique de la mitose sur le vivant. Comme nos observations sur la division ne correspondent pas parfaitement avec celle de Page sur *Vexillifera bacillipedes* (147), nous préférons pour l'instant, limiter et réserver notre identification à *Vexillifera* sp. Nous avons pensé néanmoins qu'il serait intéressant de rapporter, dès à présent, nos premières observations sur la mitose très caractéristique de cette souche.

A. Description.

■ Caractères généraux.

Notre souche CH₂a. est une amibe de type "Lobosa" avec deux territoires assez différenciés : une zone ectoplasmique antérieure et une zone endoplasmique postérieure, granuleuse, qui occupe la majeure partie de la cellule. En l'absence de toute anomalie de la division, les cellules sont en principe uninucléées. Les déplacements s'effectuent avec lenteur en glissant sur le substrat, et l'on n'observe jamais de fonctionnement pseudopodial de type éruptif.

Cette souche n'a jamais produit de kystes dans nos conditions de culture ; sa prolifération assez rapide exige des repiquages fréquents, de l'ordre de 10 ou 15 jours.

■ Dimensions.

Il s'agit d'une amibe de petite taille, dont la plus grande dimension, étalée sur le substrat, ne dépasse pas 17,3 μm en moyenne.

Ce caractère étant excessivement variable, il vaut mieux s'intéresser, comme le préconise Pussard (179) : à la taille des individus en prophase, lorsque ceux-ci présentent comme c'est le cas pour cette amibe, un contour à peu près circulaire. Nous avons ainsi obtenu à partir de 45 mesures de prophase, les résultats suivants : une dimension moyenne $\bar{\phi} = 16,1 \mu\text{m}$ pour un écart-type $\sigma = 0,98 \mu\text{m}$.

■ Morphologie.

Celle-ci est, comme dans bien des cas, très variable et donc difficile à préciser.

Il s'agit cependant d'amibes bien étalées, chez lesquelles on remarque une prédominance de formes légèrement spatulées, ou plus souvent triangulaires, s'élargissant alors de l'extrémité postérieure à l'extrémité antérieure (Cf Planche XVII. n°151 & n°154 p.185). La plus grande dimension correspond généralement au sens de progression mais, comme on peut le constater sur les microphotographies, la différence des deux dimensions est souvent peu prononcée : le rapport Longueur / largeur = 1,5 en moyenne.

Le corps de l'amibe comprend deux régions bien distinctes qui sont la zone ectoplasmique antérieure et la masse endoplasmique postérieure.

■ L'Ectoplasme.

Il se développe sous forme d'une frange à la partie antérieure de la cellule mais peut, à l'occasion, déborder légèrement sur les côtés. Sa profondeur reste limitée puisqu'elle ne dépasse pas en principe le cinquième, ou le quart de la longueur totale de la cellule sur nos microcultures.

Cette lame dépourvue de granulations présente un contour très irrégulier. Elle donne naissance sur son bord à des pseudopodes, dont le développement plus ou moins grand est lié à l'épaisseur du film liquidien où évolue la cellule. Ainsi, dans un film liquidien relativement mince ces pseudopodes ne sont qu'ébauchés, conférant un aspect échinulé, ou même franchement épineux, à la lame ectoplasmique (Cf Planche XVII. n°150 - 154 p.185). Au fur et à mesure de l'augmentation de l'épaisseur du film liquidien et de l'approche des conditions d'obtention des formes flottantes, ces pseudopodes s'allongent, deviennent digitiformes et peuvent atteindre des dimensions presque aussi importantes que celles du corps de l'amibe (Cf Planche XVII. n°155 - n°158 p.185). Leur nombre exact devient alors difficile à fixer car ils évoluent dans plusieurs plans du fait de l'épaisseur du film liquidien, ce nombre paraît se situer le plus souvent autour de la dizaine.

Ces pseudopodes, même ceux d'entre eux qui sont les plus développés, se différencient nettement des véritables filopodes (Cf. *Nuclearia simplex*), car leur amincissement n'est jamais aussi prononcé et ils gardent au contraire un diamètre assez uniforme sur toute leur longueur : l'extrémité distale est donc en principe visible et apparaît souvent arrondie. Au moment de leur rétraction, ils perdent brutalement leur rigidité apparente et flottent en se repliant de manière désordonnée.

■ L'Endoplasme.

Il occupe la majeure partie de la cellule et forme son extrémité postérieure. Celle-ci est dépourvue de toute formation uroïdale, filamenteuse, ou bulbeuse.

On retrouve au niveau de l'endoplasme les organites habituels.

■ Le noyau renferme un unique nucléole central, les cellules sont normalement uninucléées.

■ La vacuole pulsatile, en principe unique, se forme souvent à proximité du noyau. Elle peut même quelquefois l'entourer en partie comme cela se produit souvent chez *Vannella* sp. : la membrane nucléaire accolée au territoire pulsatile devient alors bien distincte (Cf Planche XVII. n°151 & n°152 p.185). La vacuole pulsatile, de contour très irrégulier au début de sa formation, s'arrondit ensuite avant chaque systole.

■ Les vacuoles digestives sont peu nombreuses et difficiles à repérer chez ces cellules de petite taille.

■ On observe en outre dans toutes les cellules sans exception, de minuscules enclaves très réfringentes, dispersées, ou quelquefois accolées en petits paquets. Leur nombre ne paraît pas dépasser la quinzaine. Ces inclusions n'offrent pas toutes une forme géométrique bien définie et constante comme chez *Saccamoeba*, cependant certaines d'entre elles présentent une forme losangique très aplatie ; nous les assimilons donc, en l'état actuel de nos observations, à de petits cristaux.

■ Division cellulaire.

Le mode de division de cette amibe se rattache à une métamitose de type banal mais présente, néanmoins, un fuseau de forme particulière et très remarquable, dont l'existence n'est pas rapportée par Page chez *V. bacillipedes* (147).

■ L'entrée en division se signale par la perte de polarisation et l'arrêt du déplacement de la cellule qui prend alors un contour circulaire.

■ Le nucléole s'estompe très progressivement à l'intérieur du noyau, tandis que le pourtour de la cellule se hérisse de très courtes expansions (Cf Planche XVII. n°159 & n°160 p.185) mais, à la différence du phénomène observé chez beaucoup d'amibes flabelluliennes, on ne note pas l'apparition de boursouflures ectoplasmiques superficielles. Le noyau demeure un court instant optiquement vide avant que n'apparaisse la plaque équatoriale.

■ Au cours de la prométaphase, il revêt un aspect très particulier que nous n'avons pu observer jusqu'à présent, que chez cette souche. L'espace nucléaire est très développé dans le sens de la largeur qui devient la plus grande dimension ; il apparaît au contraire ramassé, tron-

qué, dans le sens de la hauteur (Cf Planche XVII. n°161 & n°162 ; n°166 & n°167 p.185). La figure ainsi formée est nettement rectangulaire, avec une largeur qui atteint souvent près de 4 à 5 fois la hauteur, à l'inverse du rapport des dimensions habituellement observées à ce stade.

La plaque équatoriale, longue et grêle, traverse très normalement d'un bord à l'autre le plan médian de la figure nucléaire, l'ensemble ainsi obtenu évoquant une boutonnière (Cf Planche XVII. n°161 & 162 ; n°166 & n°167 p.185).

■ L'anaphase se déroule sans modification importante des caractères nucléaires. Le fuseau ainsi que les deux plaques de chromosomes-fils, conservent une largeur importante par rapport aux dimensions générales de la cellule (Cf Planche XVII. n°163 p.185). Mais, du fait de l'étiement du noyau, la hauteur du fuseau tend bientôt à égaler sa largeur : le rectangle aplati et écrasé de la prométaphase se transforme insensiblement en carré au cours de l'anaphase (Cf Planche XVII. n°164 & n°165 ; n°168 & n°169 p.185) tandis que la vacuole pulsatile suspend son activité après une dernière systole.

■ Les plaques de chromosomes-fils s'estompent progressivement pendant la télophase. De multiples petites vacuoles pulsatiles réapparaissent, éparpillées dans le cytoplasme des deux cellules-filles, au cours de la cytodiérèse. Il nous est difficile de repérer le moment précis de la réapparition des noyaux-fils en raison de la petite taille de ces cellules mais, dans la majorité des cas, ceux-ci sont déjà visibles peu de temps après la fin de la cytodiérèse.

B. Discussion.

■ Cette souche rappelle par bien des points *Vexillifera bacillipedes* Page 1967. La description, ainsi que les dessins donnés par cet auteur peuvent sans nul doute s'appliquer à notre souche CH₂a. La photographie fournie par Page (In : 147, page 398, fig.20), qui utilise la méthode "en goutte pendante", correspond parfaitement à l'aspect que nous obtenons avec les formes végétatives évoluant dans un film liquidien important (Cf Planche XVII. n°155 - n°158 p.185).

La différence de dimension relevée entre *V. bacillipedes* et

Planche XVII.

Souche CH₂a. : Vexillifera sp.

Photographies n°150 à n°169 : Microphotographies prises sur le vivant
en contraste de phase.

Grossissement : x 1.500 (n°150 - n°156 ; n°159 - n°169)
x 945 (n°157 & n°158)

- Photographies n°150 à n°152 : Formes végétatives "échinulées".
Dans un film liquidien très mince,
les pseudopodes ne sont qu'ébauchés.

- Photographies n°153 & n°154 : Formes végétatives épineuses.
Les petites flèches indiquent les cristaux.

- Photographies n°155 à n°158 : Formes végétatives dans un film liquidien
plus important : les pseudopodes sont
très développés mais non filiformes.

- Photographies n°159 à n°165 : Séquence mitotique réalisée sur une même
cellule.

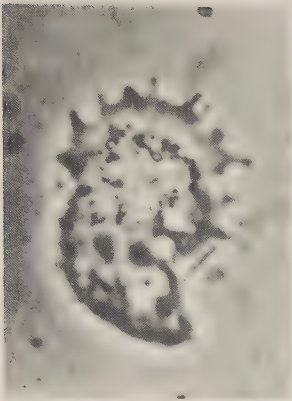
N° 159 & n° 160 : Stade prophasique. Disparition du nucléole.
 [N° 161 & n° 162 : Prométaphase.
 Remarquer l'aspect tronqué du noyau et le développement de
 la plaque équatoriale.
 N° 163 à N° 165 : Anaphase.

- Photographies n°166 & n°167 : Prométaphase sur un autre exemple
de mitose.

- Photographies n°168 & n°169 : Anaphase.

Légendes en regard des flèches :

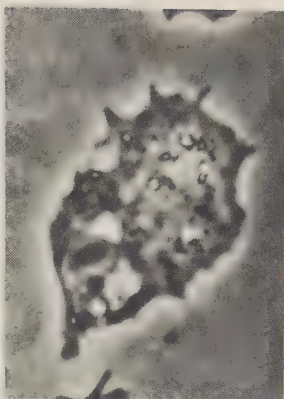
[n.] = noyau ; [p.é.] = plaque équatoriale ; [c.f.] = chromosomes-fils



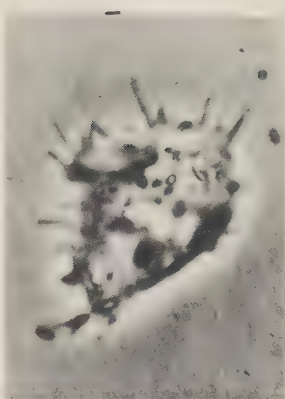
150



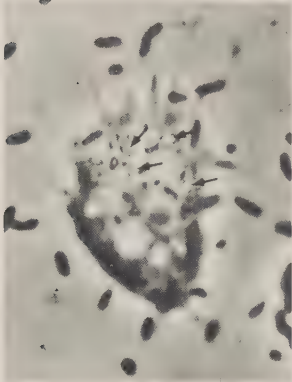
151



152



153



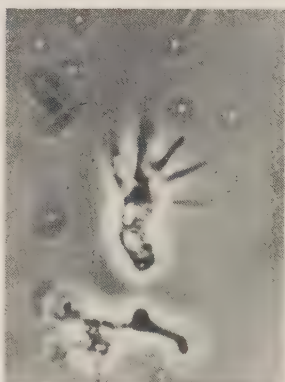
154



155



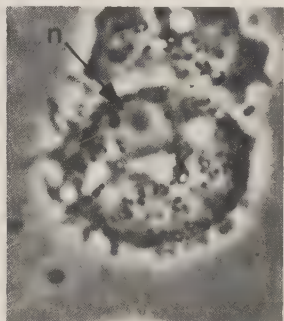
156



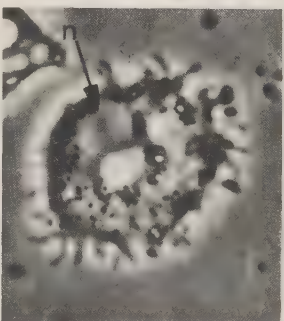
157



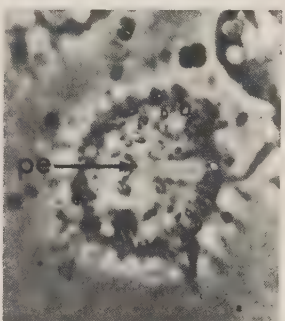
158



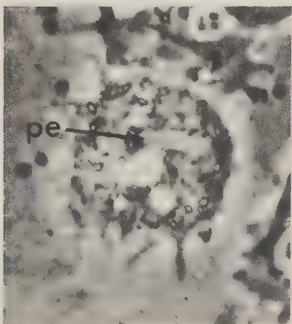
159



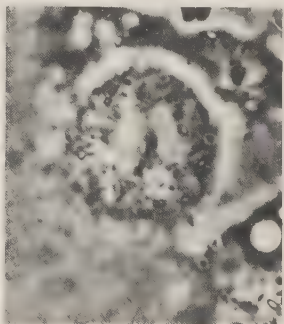
160



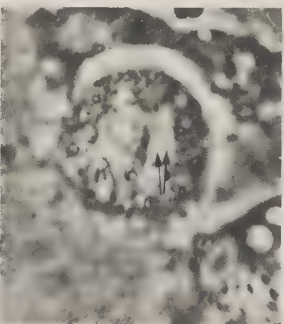
161



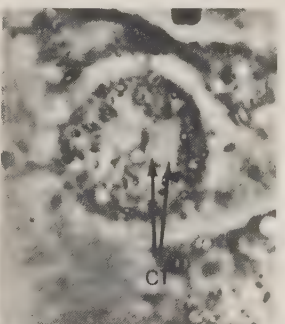
162



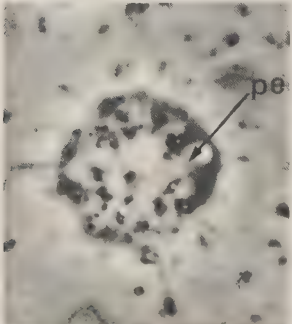
163



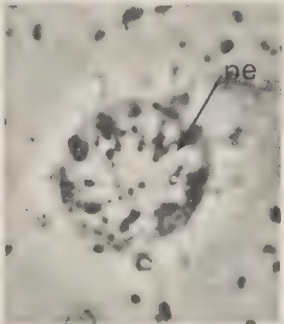
164



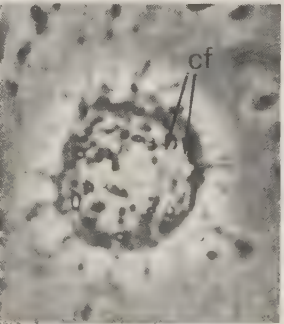
165



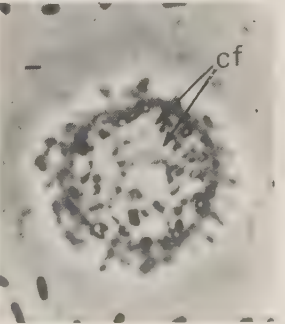
166



167



168



169

notre souche CH_2a . ($12,5 \mu m$ selon Page, au lieu de $17,3 \mu m$) ne constitue pas à notre avis, un critère suffisant pour en faire deux espèces distinctes : nous mesurons en effet des amibes étalées sur le substrat, donc logiquement moins ramassées que celles observées par Page dans les conditions expérimentales qu'il emploie.

■ Par contre, deux autres constatations, qui ne figurent pas dans la description de Page, nous empêchent d'identifier totalement notre souche à *V. bacillipedes* : la présence des enclaves cristallines et surtout l'aspect très particulier présenté par le fuseau et la plaque équatoriale au cours de la division.

■ L'existence de cristaux dans l'endoplasme de notre souche, alors que Page signale au contraire leur absence, constitue un premier argument, même si celui-ci n'apparaît pas suffisant pour justifier la création d'une nouvelle espèce en l'état actuel des connaissances sur le métabolisme de ces cellules.

■ En revanche, le deuxième point nous paraît singulièrement important. Jusqu'à présent, Schaeffer (198) et Bovee (20) n'ayant pas observé la division, seul Page (147,154) a étudié la mitose de ce genre. Selon cet auteur la division, aussi bien chez *V. bacillipedes* que chez *V. telmathalasae*, correspond à une métamitose banale (Pussard *stricto sensu*) sans particularité notable, à la différence de ce que nous avons pu relever chez notre souche.

C'est Dobell qui, le premier, a pris en considération la forme du fuseau mitotique dans la description d'une amibe en remarquant un fuseau "en brosse" chez *Amoeba fluvialis* (76 bis). Volkonsky, par la suite, a essayé d'utiliser ce caractère pour séparer les genres *Hartmannella* et *Acanthamoeba* au sein de la sous-famille des *Hartmannellinae* (241). Enfin, plus récemment, Pussard (177) montre que l'étude du fuseau et de la plaque équatoriale permet de séparer deux espèces d'*Acanthamoeba* : *A. comandoni* et *A. astronyxis*. Il est certain que ce caractère reste souvent d'une observation peu commode ou peu caractéristique. Néanmoins il ne doit pas être négligé car il peut rendre, comme nous venons de le constater, de précieux services.

Il convient maintenant d'établir, par l'étude comparative d'autres souches de *Vexillifera*, si l'aspect très particulier de la figure mitotique que nous avons observée chez notre souche CH₂a. reste un fait isolé, caractéristique d'une espèce, ou s'il est au contraire partagé par d'autres espèces dans ce genre.

Observation d'une Amibe à Pseudopodes Type "filosa",
Nuclearia simplex Cienkowski 1865
 (Protozoa, Rhizopodea, Filosia, Aconchulinida)

La systématique des amibes à pseudopodes filamenteux est encore plus confuse que celle des amibes "lobosa". Certains de ces micro-organismes sont rassemblés en effet dans la classe des Filosia créée pour les amibes à filopodes ; tandis que d'autres sont regroupés pêle-mêle parmi les pseudo-héliozoaires, notamment dans l'ordre des Protéomyxées (235). Certains genres, - tel *Arachnula* Cienkowski 1876 -, changent d'ailleurs de groupe selon l'auteur consulté, ce qui témoigne de l'arbitraire de la classification et de l'insuffisance de nos connaissances sur les Amoebiens nus pourvus de filopodes. De plus, les premières descriptions de ces genres datent de la seconde moitié du XIX^{ème} et du début du XX^{ème} siècles : fort imprécises et accompagnées d'une illustration très réduite, elles ont rarement été complétées par de nouvelles observations.

La souche que nous présentons paraît au mieux correspondre au genre *Nuclearia* Cienkowski 1865. Par ses affinités, ce genre actuellement rangé parmi les pseudo-héliozoaires "Incertae sedis", nous semble pouvoir se rattacher à la Sous-classe des Filosia, ordre des Aconchulinida.

A. Description.

■ Caractères généraux.

Il s'agit d'une amibe de type Filosa à endoplasme et ectoplasme peu différenciés, dont le corps cellulaire se déforme peu, et lentement.

Les individus sont en majorité uninucléés, mais on observe aussi quelquefois en microcultures, des cellules à nombre variable de noyaux (blocage de la cytodiérèse : Cf. p. 198).

En culture sur gélose, au bout d'un temps variant de 10 à 20 jours, un certain pourcentage d'individus paraît évoluer vers une forme prékystique. Nous ne pouvons encore préciser si l'évolution finale de ces formes conduit à un véritable kyste, viable et capable de redonner naissance à une cellule.

■ Dimensions.

Bien que les résultats de mensuration d'amibes soient de signification et de portée réduites, ils permettent néanmoins de fixer un ordre de grandeur.

Notre souche mesure en moyenne $29\mu\text{m} - 32\mu\text{m} \times 19\mu\text{m} - 20\mu\text{m}$, soit un rapport moyen Longueur / largeur = 1,5.

■ Morphologie cellulaire.

Toutes les conformations sont possibles, mais cette amibe montre le plus souvent un contour arrondi, ovoïde, ou oblong, plus rarement elle peut présenter un aspect allongé, fusiforme.

La dimension la plus longue est généralement celle du sens de progression mais, comme le souligne le rapport L/l , la différence est peu marquée.

■ Pseudopodes.

Ils confèrent à l'amibe une physionomie caractéristique.

Il s'agit de pseudopodes filamenteux qui peuvent atteindre de grandes dimensions, jusqu'à 1,5 ou 2 fois la longueur du corps cellulaire proprement dit.

■ Leur émission prédomine souvent en une région, sous la forme d'un tronc pseudopodique principal dont la localisation correspond au pôle antérieur de la cellule (Cf Planche XVIII. n°170 - n°173 p.195) mais, à côté de cette polarisation antéropostérieure très fréquente, des expansions filamenteuses peuvent s'observer également en n'importe quel point du contour cellulaire : elles sont en principe moins développées que celles déployées au niveau du tronc pseudopodique principal.

Chez les individus plus allongés, fusiformes, on constate souvent la présence d'un pôle pseudopodial à chacune des deux extrémités (Cf Planche XVIII. n°177 p.195). Cet aspect semble correspondre à des formes quelque peu "hésitantes", la reprise d'une locomotion normale entraînant la rétraction, puis la résorption de l'un des deux troncs pseudopodiques (Cf Planche XVIII. n°176 p.195). Lors de la rétraction, on remarque la formation de petits renflements, ou boursouflures, qui apparaissent en série sur les filopodes.

■ Les filaments sont, suivant les cas, plus ou moins ramifiés et se divisent par dichotomie, mais ils ne paraissent jamais s'anastomoser entre eux. Ils sont formés d'ectoplasme et ne renferment jamais de granulations. Ce dernier caractère les rattache donc au type "filosa" de De Saedeleer. La description originale du genre *Nuclearia* par Cienkowski en 1865.(59) ne mentionne pas l'existence de ramifications au niveau des pseudopodes, en revanche, les auteurs ultérieurs comme Penard (165), Sandon (190), Nikoljuk (140), Liepinis & Coll.(128), signalent l'existence de bifurcations.

Les filaments les plus étendus se développent à partir de petites protubérances ectoplasmiques ; ils vont en principe en s'amincissant depuis leur base jusqu'à leur extrémité, qui peut atteindre une finesse à la limite de la visibilité.

Il existe aussi des pseudopodes moins effilés qui se présentent comme de petites lamelles ectoplasmiques et qui conservent à peu près leur largeur initiale sur une grande dimension. L'extrémité de ces lamelles peut ensuite donner naissance à deux fins filopodes qui s'insèrent sur chaque bord de l'expansion. Penard (165) a fort bien décrit ce phénomène : "- ... la branche-mère, en arrière de la bifurcation, est relativement très large sur toute sa longueur, puis à ce sommet prennent naissance, à gauche et à droite, deux filaments beaucoup plus fins qui semblent plutôt greffés sur un tronc brusquement tronqué, que produits par une bifurcation ordinaire".

■ Les pseudopodes jouent un rôle important dans la capture de l'aliment bactérien, en retenant à la manière d'une "trompe" une ou deux bactéries, qui vont ensuite glisser lentement à la surface de l'expansion filamenteuse, comme si elles étaient attirées vers le corps cellulaire où se produit l'ingestion de la proie dans une vacuole.

On remarque en outre, les particularités suivantes. D'une part, souvent les cellules ne sont pas en contact intime avec les germes, mais apparaissent auréolées d'un espace vide qui les sépare du milieu bactérien (Cf Planche XVIII. n°175 p.195). D'autre part, il est possible de suivre le cheminement des amibes à la "trace", car des travées sinueuses persistent après leur passage au milieu des germes (Cf Planche XVIII. n°176 p.195).

Ces constatations, faites aussi bien en cultures sur boîte qu'à l'occasion de microcultures, s'expliquent sans doute par la présence des expansions filamenteuses qui débordent largement le pourtour cellulaire ; la touffe pseudopodiale antérieure s'immisçant entre les bactéries, les écartant progressivement, ouvrirait ainsi la "voie" à la cellule.

La réalisation de réactions cytochimiques par le bleu Alcian et le PAS permet de mettre en évidence un glycocalyx très net, et particulièrement important sur le pourtour de la cellule. La coloration par le bleu Alcian étant encore obtenue à pH 0,9, il doit s'agir d'un revêtement de mucopolysaccharides sulfatés (Pussard : communication personnelle).

■ L'examen de formes flottantes, c'est-à-dire de formes végétatives mises en suspension dans l'eau, après une légère agitation mécanique permet d'observer un aspect quelque peu différent comme c'est souvent le cas pour d'autres amibes.

Les trophozoïtes montrent alors un corps cellulaire arrondi, de $14,4\ \mu\text{m}$ environ, qui émet sur tout son pourtour des pseudopodes filamenteux rayonnants (Cf Planche XVIII. n°178 p.195). Ces filaments d'une finesse extrême, encore plus ténus et plus allongés que ceux observés sur nos microcultures, multiplient par 4 ou 5 le diamètre du corps cellulaire. Leur ramification, bien que possible, est plus rare que chez les cellules fixées au substrat.

Ces filopodes flottent dans l'eau de façon assez désordonnée et présentent souvent des cassures à angle droit, qui surviennent brutalement avant leur rétraction. L'aspect des formes flottantes évoque donc fortement celui des héliozoaires et permet de comprendre pourquoi Penard (165) puis Sandon (190) classent le genre *Nuclearia* parmi les pseudo-héliozoaires, alors que d'autres, comme Blanc-Brude & Coll.(17) notent simplement cette ressemblance.

Lorsque les formes flottantes reprennent contact avec le substrat, elles retrouvent rapidement une polarisation et l'aspect habituel que nous avons décrits.

■ Corps cellulaire.

Il est presque entièrement occupé par l'endoplasme, l'ectoplasme apparaissant surtout à la base des troncs pseudopodiques principaux. De toute façon la délimitation de ces deux régions n'est jamais très marquée comme chez certaines amibes.

L'endoplasme renferme les enclaves habituelles, un noyau, des vacuoles contractiles, des vacuoles digestives.

■ Le noyau.

Le noyau correspond au type courant rencontré chez les amibes. Il est vésiculeux, renfermant un nucléole central, unique, dont le diamètre reste généralement faible par rapport au diamètre maximum du noyau : leur rapport varie du tiers à la moitié. Le nucléole de certains individus montre quelquefois la présence d'une lacune optiquement vide.

La proportion de cellules binucléées est, en fait, assez faible et résulte d'un blocage de la cytodierèse comme nous le verrons plus loin.

■ Les vacuoles contractiles.

Cette amibe présente plusieurs vacuoles contractiles se vidant indépendamment. Elles sont de tailles différentes. On en compte généralement 3 ou 4 bien visibles, disséminées au hasard et souvent accompagnées par d'autres, plus petites.

■ Les vacuoles digestives.

Nombreuses, petites, elles se distinguent en principe des précédentes par leur transparence optique plus faible. Suivant les cas, elles renferment des résidus bactériens, visibles ou non.

L'ensemble de ces systèmes confère donc au protoplasme un aspect assez vacuolaire.

■ Kyste.

Après un temps assez long de 10 à 15 jours, un certain pourcentage d'individus évoluent vers un état prékystique.

Le corps cellulaire diminue de taille, s'arrondit et devient très réfringent par suite de la densification du cytoplasme. L'examen de ces cellules après coloration au PAS ou au bleu Alcian, met en évidence une hypertrophie de la couche mucopolysaccharidique périphérique dont la

Planche XVIII.

Souche $GE_1c.$: Nuclearia simplex.

Photographies n°170 à n°178 : Microphotographies prises sur le vivant,
en contraste de phase.

Grossissement : x 945 (n°170 - n°177) ; x 1.500 (n°178)

■ Photographies n°170 à n°173 : Amibes en locomotion.

■ Photographie n°174 : Forme immobile.

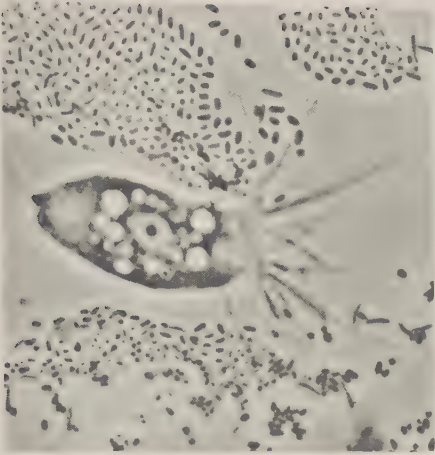
■ Photographie n°175 : Amibe entourée de germes.

Remarquer l'auréole caractéristique.

■ Photographie n°176 : Fin de la rétraction d'un tronc pseudopodique postérieur.

■ Photographie n°177 : Individu fusiforme présentant 2 troncs pseudopodiques opposés.

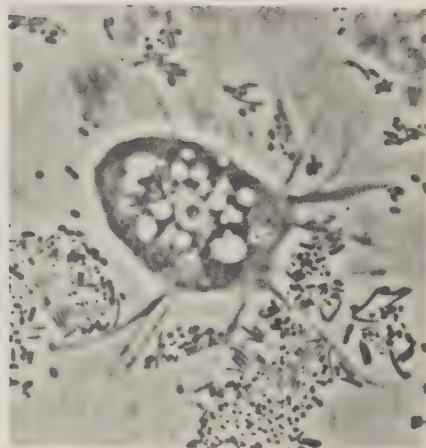
■ Photographie n°178 : Forme flottante.



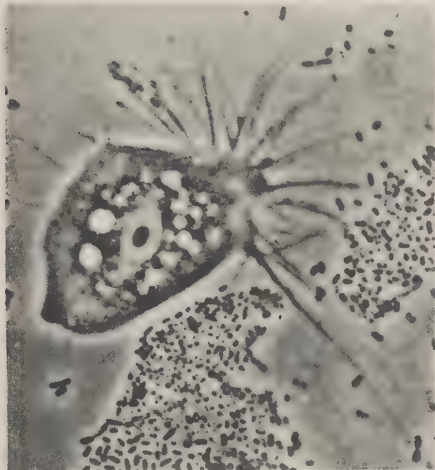
170



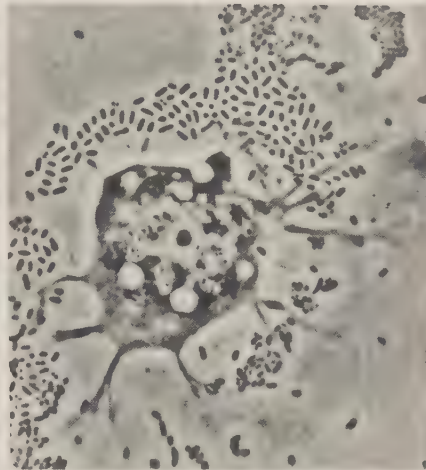
171



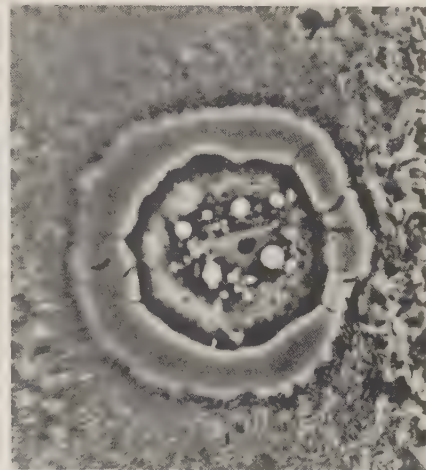
172



173



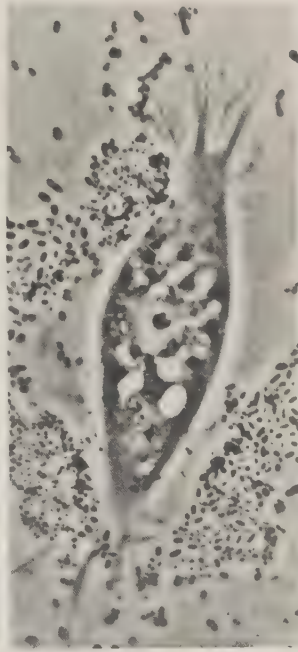
174



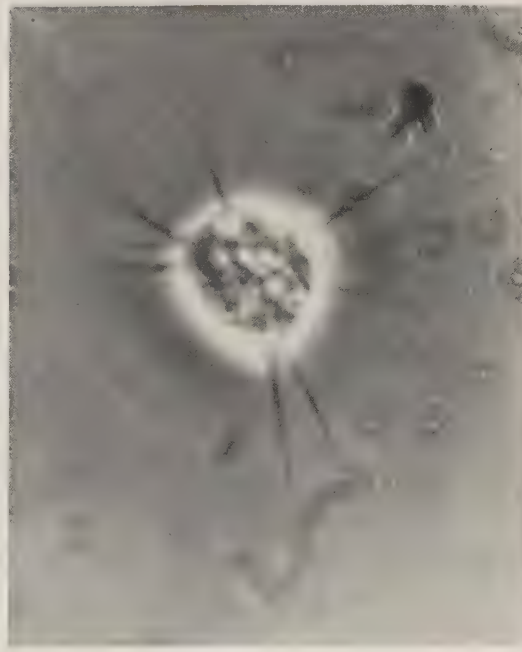
175



176



177



178

coloration est très soutenue.

Cette évolution semble se poursuivre pour aboutir finalement à des kystes d'apparence curieuse, visibles sur d'anciennes cultures. Ils mesurent environ $11,5\ \mu\text{m}$ et sont caractérisés par l'existence d'une paroi mince, décollée du protoplasme autour duquel elle constitue une sorte de coquille. La cellule apparaît rétractée à l'intérieur de cette paroi qui est souvent ornée de dépôts granuleux. L'espace vide qui sépare le corps cellulaire de la paroi kystique semble augmenter avec l'âge (Cf Planche XIX. n°188 & n°189 p.201).

Les photographies des kystes de notre souche rappellent fortement les dessins de *Nuclearia simplex* réalisés par Cienkowski en 1865. Cet auteur distingue également une coque externe indépendante du protoplasme.

Cienkowski décrit aussi le dékystement de cette espèce qui, selon lui, nécessite la traversée successive de deux parois. Pour notre part, nous doutons encore de la viabilité réelle des kystes arrivés à cet état de déshydratation et nous n'avons pas encore eu l'occasion d'observer de dékystement.

■ Division cellulaire.

La mitose se déroule selon le processus le plus fréquemment rencontré chez les amibes, c'est-à-dire une **métamitose**.

■ La cellule qui entre en division perd sa polarité de déplacement. Elle se repère par un contour parfaitement circulaire, hérissé de pseudopodes très fins et beaucoup plus courts que ceux développés habituellement, l'ensemble évoquant l'aspect d'un oursin.

■ La **prophase** se caractérise en outre, par la disparition lente et progressive du nucléole qui devient flou et finit par s'estomper totalement (Cf Planche XIX. n°179 & n°180 p.201).

■ Il n'y a pratiquement pas de vide optique du noyau : la plaque **prométaphasique** commence à apparaître tout de suite et se constitue de façon de plus en plus nette.

■ La disparition de la membrane nucléaire se produirait au cours de la **métaphase**, le fuseau revêt alors, à ce moment, un aspect nettement losangique sur certaines observations. On remarque quelquefois, dès la métaphase, deux formations en calottes polaires à chaque

extrémité du fuseau, elles deviendront beaucoup plus visibles au stade suivant (Cf Planche XIX. n°181 p.201).

■ L'anaphase se déroule rapidement. Les deux lots de chromosomes-fils sont alors nettement surmontés, au cours de leur ascension, par des calottes polaires en forme de bandes sombres, parallèles aux deux plaques chromosomiques (Cf Planche XIX. n°182 & n°183 p.201). En fin d'anaphase, les deux lots chromosomiques viennent se confondre et fusionner avec les calottes polaires (Cf Planches XIX. n°184 & n°185 p.201).

■ Au cours de la télophase toute distinction entre les deux formations devient alors impossible, le devenir du matériel chromosomique est suivi avec plus de difficulté durant cette dernière étape. A la fin de la télophase, les vacuoles contractiles suspendent leur activité pour un court instant puis réapparaissent, petites et nombreuses, en même temps que s'amorce la cytotdiérèse. La fin de la division cytoplasmique montre souvent un aspect asymétrique, car le cordon cytoplasmique qui relie les deux cellules-filles est rejeté latéralement (Cf Planche XIX. n°186 & n°187 p.201). La membrane nucléaire se reforme avant l'achèvement de la cytotdiérèse, en même temps que se reconstituent les grains nucléolaires qui fusionneront ensuite (Cf Planche XIX. n°187 p.201).



■ Assez fréquemment nous avons constaté sur nos microcultures un blocage de la cytotdiérèse : le sillon de division, pourtant amorcé, avorte puis régresse même, produisant alors une cellule binucléée.

Cet état binucléé est sans doute provisoire et doit finalement aboutir à une séparation puisque nous avons pu observer, à plusieurs reprises, des "cytotdiérèses différées" telles que Pussard en a signalées pour *Acanthamoeba* : la division cytoplasmique de ces individus binucléés s'effectue alors de manière très lente et par un étirement très progressif (172).



■ Cette observation de la division, telle que nous avons pu la suivre sur le vivant, correspond assez bien avec l'excellente description de la mitose donnée par Bělař en 1926 (16) pour *Nuclearia* sp.

Planche XIX. : Souche GE_1c : Nuclearia simplex.

(suite)

Planche XIX.

Souche GE₁c. : Nuclearia simplex (suite)

Photographies n°179 à n°189 : Microphotographies prises en contraste de phase sur le vivant.

Grossissement : x 1.500 (n°179 - n°185 ; n°188 & n°189)
x 945 (n°186 & n°187)

■ Photographies n°179 & n°180 : Stades prophasiques.

Perte de la polarisation ; effacement progressif du nucléole.

■ Photographie n°181 : Prométaphase avec plaque équatoriale.

■ Photographies n°182 & n°183 : Anaphase.

Les deux lots de chromosomes-fils sont surmontés chacun d'une calotte polaire.

■ Photographies n°184 & n°185 : Fin d'anaphase.

Les lots chromosomiques fusionnent avec les calottes polaires.

■ Photographies n°186 & n°187 : Cytodiérèse.

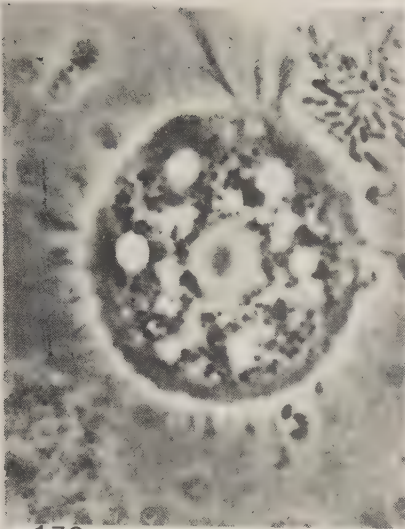
Cordon cytoplasmique déjeté.

■ Photographies n°188 & n°189 : Kystes.

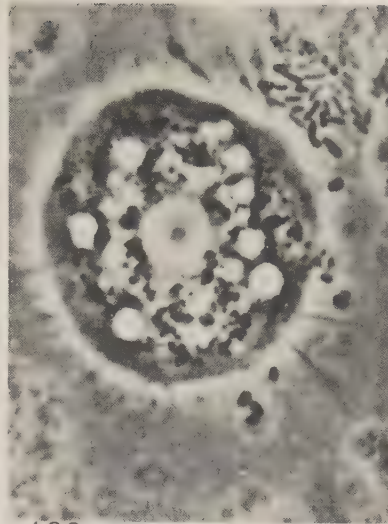
Noter l'espace vide séparant le protoplasme de la paroi.

Légende en regard des flèches :

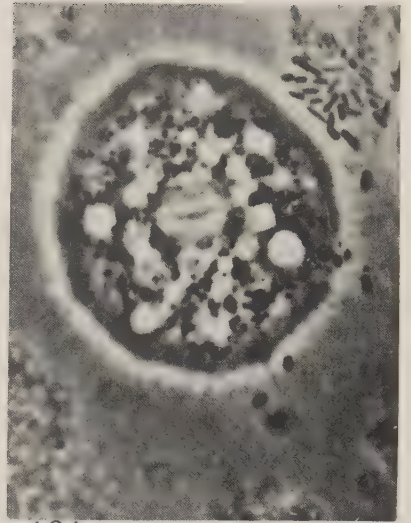
[c.p.] = calottes polaires ; [c.f.] = chromosomes-fils ; [n.f.] = noyaux-fils



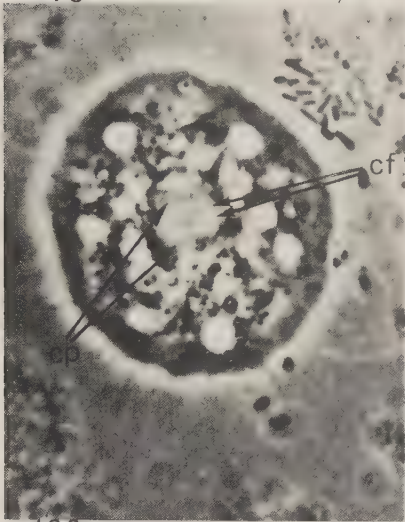
179



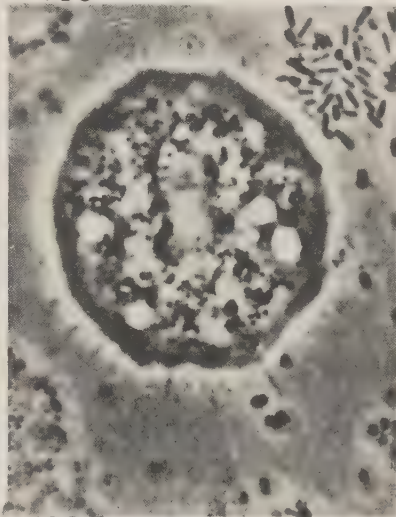
180



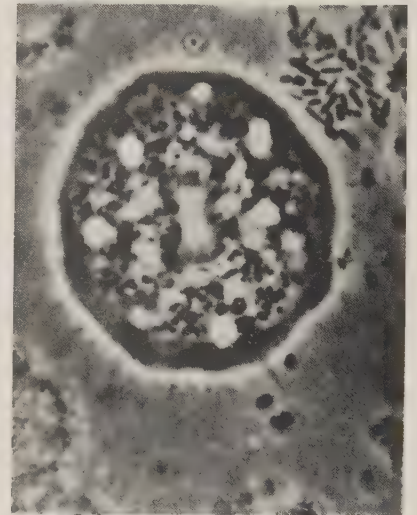
181



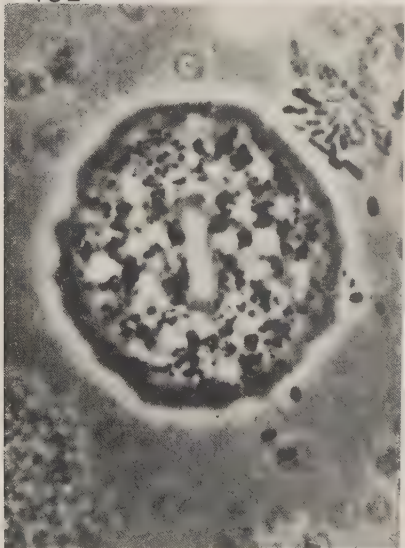
182



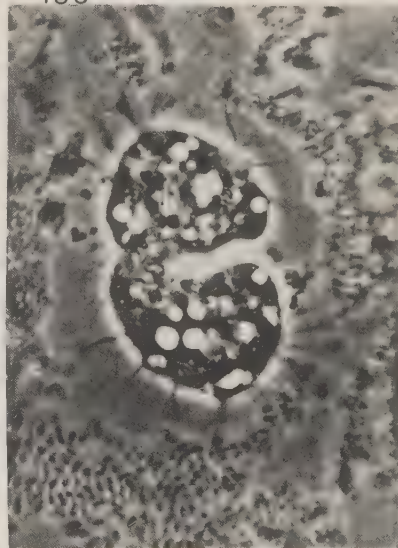
183



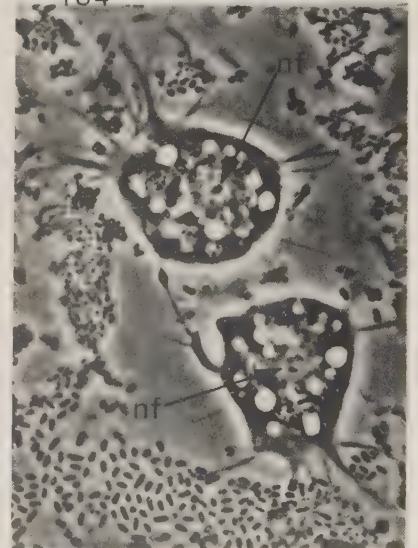
184



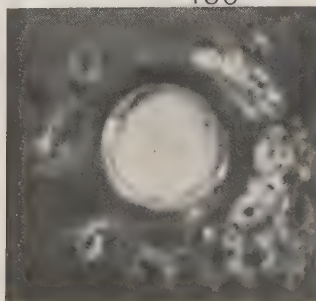
185



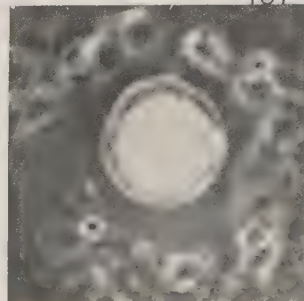
186



187



188



189

B. Discussion.

Aucune des espèces actuellement décrites parmi les classes des Fillosia ou des Granuloreticulosia ne paraît correspondre à notre souche.

Nous pensons qu'il vaut mieux réserver les genres *Gymnophrys* Cienkowski 1876, *Blomyxa* Leidy 1876, (*Granuloreticulosia*, *Athalamida*), et *Penardia* Cash 1904 (*Fillosia*, *Aconchulinida*), pour des amibes à pseudopodes filamenteux et anastomosables : chacune des espèces-types de ces trois genres présentant cette particularité.

■ Il faut cependant noter que tous les auteurs n'ont pas attaché la même importance au caractère de réticulation. Ainsi De Saedeleer (189) redécrit sous le nom de *Penardia cometa*, un micro-organisme à pseudopodes non anastomosés. De la même façon, Hollande (98) décrit une nouvelle espèce, *Blomyxa merdaria*, dont les pseudopodes ne sont pas anastomosés, alors que l'espèce-type, *Blomyxa vagans* Leidy 1876 présente des pseudopodes anastomosables.

Il nous semble néanmoins que le caractère de réticulation, d'observation facile, doit être pris en considération : continuer à le négliger risque de lui faire perdre rapidement toute importance sur le plan de la systématique.

Chez notre souche, il n'existe manifestement pas d'anastomoses au niveau des pseudopodes, simplement des entrecroisements et des chevauchements : les pseudopodes se recoupent dans des plans différents et peuvent, par effet optique, prêter à confusion quant à leur aspect.

De même les genres *Gymnophrys* et *Blomyxa* diffèrent du genre *Penardia* par la nature de leurs pseudopodes. En effet, dans ses descriptions Cash (36,37) signale la présence de granules bien visibles dans les filopodes des deux premiers genres alors qu'il n'en mentionne pas pour le genre *Penardia*. De Saedeleer (189) reprend nettement cette distinction : pour cet auteur les pseudopodes du genre *Penardia* sont du type "filosa" stricto sensu, c'est-à-dire dépourvus de granulations.

Or, par certains caractères, notre souche s'apparente à la description de *Penardia cometa* (Penard 1902) (164) donnée par De Saedeleer (189) : pseudopodes filamenteux sans granulations et non anastomosables, existence fréquente d'un tronc pseudopodique principal.

■ Toutefois, malgré ces points communs, nous n'identifierons pas notre souche avec *Penardia cometa*. D'une part en raison des caractères suivants, mentionnés par De Saedeleer, qui s'écartent trop de nos observations : une dimension de $8,5\mu\text{m}$ plus faible que la nôtre ; une seule vacuole contractile alors que la nôtre en comporte plusieurs. D'autre part, nous pensons qu'il vaut mieux réserver le genre *Penardia* pour des amibes à pseudopodes anastomosables de type "filosa" au sens strict du terme.

■ Il nous paraît donc impossible de retenir l'un des trois genres précédents pour cette souche, que nous identifierons, par contre, avec *Nuclearia simplex* Cienkowski 1865.

Le genre *Nuclearia* a été créé par Cienkowski (59) pour des amibes proches des *Vampyrellidae*, munies de pseudopodes filamenteux rayonnant sur tout le pourtour du corps, ou seulement en quelques endroits.

■ Dès 1865 l'auteur décrit deux espèces : *Nuclearia delicatula*, espèce-type que nous écarterons en raison de l'existence de plusieurs noyaux, et *Nuclearia simplex*, qui se différencie de la précédente par la présence d'un seul noyau et par la formation de kystes dont l'aspect, d'après les dessins de Cienkowski, évoque fortement ceux que nous observons chez notre souche.

Par la suite, Penard (165), puis Sandon (190), classent le genre *Nuclearia* parmi les pseudo-héliozoaires. Cette classification résulte probablement des conditions d'observation de ces auteurs qui utilisaient un milieu liquidien important où prédominent les formes flottantes.

■ Cienkowski ne signale pas de bifurcations dans la description originale mais, par la suite, la plupart des auteurs comme Penard (165), Sandon (190), Nikoljuk et Gel'cer (140), reconnaissent leur existence.

Si la constatation de ces bifurcations ne pose aucune difficulté pour les formes végétatives fixées au substrat, leur mise en évidence s'avère délicate quand on examine des formes flottantes où la production de ramifications paraît plus rare.

■ L'existence d'une enveloppe mucilagineuse chez le genre *Nuclearia* semble très inconstante suivant les espèces. Penard dès 1903 (165) en signale la présence autour de certains individus seulement, appartenant à l'espèce qu'il décrit sous le nom de *Nuclearia caulescens*. Blanc-Brude & Coll. (17) retrouvent avec facilité cette enveloppe muqueuse pour

Nuclearia delicatula ; par contre, ni Cienkowski (59) ni Sandon (190) ne la mentionnent.

Pour notre part, nous n'avons jamais pu constater d'enveloppe mucilagineuse sur le vivant, mais nous rappelons que les colorations au PAS et au bleu Alcian montrent l'existence d'un glycocalyx très net et particulièrement important, ce qui corrobore finalement assez bien la tendance du genre à sécréter une couche muqueuse, visible ou non, suivant les espèces, ou peut-être même suivant les souches.

■ La mitose telle que nous la suivons sur le vivant, correspond à celle décrite par Bělář (16) pour *Nuclearia* sp. Toutefois, les dessins de cet auteur montrent une persistance de la membrane nucléaire qui n'est pas facile à vérifier sur le vivant.

Bělář avait très bien remarqué la présence des calottes polaires visibles au moment de l'anaphase. Il est possible d'interpréter ce phénomène comme la reconstitution prématurée des nucléoles au moment de l'anaphase. Il ne faut pas pour autant, confondre ce type de mitose avec une promitose. En effet, dans le cas présent, on observe bien au moment de la prophase, la disparition préalable du nucléole.

Cette présence de calottes polaires au cours de la métaphase ou de l'anaphase ne nous paraît pas exceptionnelle puisque nous avons pu l'observer avec plus de netteté encore chez une autre de nos souches, très différente du genre *Nuclearia* : *Vannella* sp. (Cf.p.167). Sawyer vient de signaler également ce phénomène dans une publication récente (196) pour deux de ses nouvelles espèces : *Mayorella corlissi* et *Vexillifera pagel*.

■ Ainsi, l'ensemble de nos observations nous a conduit à identifier cette souche avec *Nuclearia simplex* Cienkowski 1865 dont on peut donner la diagnose suivante :

Genre : *Nuclearia*

- ★ Amibes émettant des pseudopodes de type "filosa" sans granulations, ramifiés ou non, non anastomosés entre eux, regroupés en un tronc pseudopodial antérieur lors de la locomotion.
- ★ Formes flottantes évoquant fortement l'aspect d'un héliozoaire.
- ★ Un ou plusieurs noyaux à nucléole central.
- ★ Formes végétatives entourées parfois d'une enveloppe mucilagineuse chez certaines espèces.

.../..

... / ..

★ Division par métamitose avec calottes polaires nettes à l'anaphase.

➡ Espèce : *Nuclearia simplex*

★ Elle possède les caractères du Genre.

✱ Dimensions des formes adhérentes au substrat :

$30\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$

✱ Individus en principe uninucléés.

✱ Plusieurs vacuoles contractiles.

✱ Pas d'enveloppe mucilagineuse discernable,
mais existence d'un glycocalyx très important.

✱ Formation de pseudokystes.

Observation d'une nouvelle Espèce :

Comandonia operculata, n.g., n.sp., Acanthamoebidae.

Page a récemment (159) distingué la nouvelle famille des Echinamoebidae (Lobosia) de celle des Acanthamoebidae Sawyer 1974 (195), parce qu'elle rassemble des amibes de formes plutôt étalées, qui se rapprochent du genre Acanthamoeba par l'émission de petites et fines projections, mais s'en différencient essentiellement, selon l'auteur, par la nature du kyste.

La création de cette nouvelle famille est justifiée dans la mesure où les ordres Aconchulinida (Filosia) et Athalamida (Granuloreticulosia) sont réservés à des amibes nues présentant des pseudopodes filamenteux, granuleux et anastomosés chez le second ordre, mais bien plus développés, - filopodes -, que dans le cas des espèces créées par Page dans la nouvelle famille des Echinamoebidae.

L'amibe que nous décrivons ici, représente en quelque sorte une transition entre Acanthamoebidae et Echinamoebidae. Son rattachement à l'une ou l'autre de ces deux familles s'avère donc particulièrement délicat. De toute façon, comme aucun des quatre genres composant actuellement ces deux familles, soit Acanthamoeba pour l'une, Echinamoeba, Stachyamoeba, Filamoeba, pour l'autre, ne convient pour notre souche, le genre *Comandonia* est créé avec *Comandonia operculata* comme espèce-type. En raison de la structure du kyste et du mode de dékystement, nous préférons rattacher ce nouveau genre à la famille des Acanthamoebidae.

A. Description. (*)

Caractères généraux.

Comandonia operculata est une amibe de type "Lobosa". On lui distingue deux zones faiblement différenciées : un ectoplasme réduit et un endoplasme granuleux qui occupe la majeure partie de la cellule. Mal-

(*) La description de cette souche doit faire l'objet d'une publication ultérieure, en collaboration avec MM. Pussard et Pons.

gré d'assez fréquents blocages de la cytodierèse, les individus sont en général uninucléés. Les déplacements s'effectuent avec lenteur et sans pseudopodes éruptifs. Dans nos conditions de culture en gélose, les trophozoïtes s'enkystent très régulièrement et sans difficulté.

■ Dimensions.

Comandonia operculata présente une taille relativement importante puisqu'elle mesure en moyenne $40\ \mu\text{m}$ dans sa plus grande dimension.

En raison de l'extrême variabilité de ce caractère, il est préférable, nous l'avons vu, d'indiquer la taille des individus en prophase qui constituent un groupe plus homogène. On compare ainsi des cellules arrivées à un même moment du cycle cellulaire, présentant une morphologie identique et géométriquement plus simple. Nous obtenons, sur 50 observations de prophase, une mesure moyenne $\bar{x} = 36,1\ \mu\text{m}$ avec un écart-type $\sigma = 3,7\ \mu\text{m}$.

■ Morphologie cellulaire.

Il est difficile de schématiser la forme de *Comandonia operculata* en raison de sa grande variabilité. Il est en outre impossible de la rattacher à un modèle amibien courant, tel que le type "limax" vermiforme par exemple, ou à un aspect flabellulien caractérisé par un voile ectoplasmique bien développé. Le rattachement à une morphologie bien déterminée s'avérant délicat, les illustrations photographiques n'en prennent que plus d'intérêt.

Comandonia operculata s'étale et se déploie largement sur le substrat, de sorte que la plus grande dimension n'est pas forcément celle du sens de la progression.

■ L'ectoplasme.

Bien que facile à mettre en évidence, il se différencie plus difficilement de l'endoplasme que chez les amibes de type flabellulien. Il constitue une bordure limitée, peu profonde, qui reste localisée à la partie antérieure de la cellule, ou déborde légèrement par côté. L'opacité plus ou moins prononcée de cette zone en contraste de phase, traduit les variations notables de son épaisseur et, en certains points, elle apparaît extrêmement mince.

Malgré son faible développement, l'importance de la frange ectoplasmique ne doit pas être ignorée puisque seul, son aspect pourrait permettre de rattacher cette souche aux Echinamoebidae.

■ Sur ce contour s'insèrent de fines projections ectoplasmiques comparables à des épines : elles donnent un aspect hérissé à la cellule (Cf Planche XX. n°190 - n°192 p.217). Ces expansions n'existent pas en permanence et, lorsqu'elles sont présentes, leur répartition est inégale sur toute la périphérie de l'ectoplasme. Il nous semble important de souligner ces faits, d'autant que l'émission de ces expansions ne correspond pas aux déformations initiales de l'ectoplasme, ni à ses mouvements les plus actifs, comme nous le verrons ci-après.

■ Au cours des transformations du protoplasme accompagnant tout déplacement, la zone ectoplasmique est en principe conservée à la partie antérieure de la cellule.

Les mouvements incessants qui animent l'ectoplasme en affectent des portions importantes, quoique localisées. Ils débutent toujours sous la forme de petites poussées assimilables à des déformations de type "lobosa" puis la lame ectoplasmique, poursuivant son mouvement, prend un contour de plus en plus accidenté et l'avancement de la zone déplacée s'achève par l'apparition de quelques expansions épineuses, parfois fourchues, dont l'existence est en principe de courte durée puisqu'elles seront réabsorbées et disparaîtront avec la vague ectoplasmique suivante.

Chez *Comandonia operculata* l'émission des "échinopodes" doit être considérée comme un épiphénomène, secondaire aux déformations touchant l'ectoplasme : les échinopodes ne représentent pas l'amorce du mouvement mais plutôt son achèvement.

Malgré son aspect hérissé, *Comandonia operculata* se rattache donc indiscutablement aux amibes de la classe des Lobosia. Le fait devient plus évident encore lorsqu'on examine l'amibe dans un film liquidien beaucoup plus mince, où la formation des échinopodes ne se fait plus : les pseudopodes émis par ces formes moins actives sont alors nettement lobés (Cf Planche XX. n°193 p.217).

■ On constate souvent des formes circulaires, apparemment "hésitantes", ayant perdu toute polarisation, et qui réagissent à l'excitation lumineuse par l'émission .../ p.210

sur tout leur pourtour, de longs pseudopodes boudinés. Cette configuration peut persister un certain temps avant que la cellule ne retrouve un sens de polarisation.

■ L'endoplasme.

Très granuleux du fait de sa richesse en inclusions, il occupe la majeure partie de la cellule.

L'extrémité postérieure des formes végétatives traîne souvent une houppe de filaments uroïdaux particulièrement développée. La touffe collopodiale offre un aspect très différent de celui observé chez *Saccamoeba* : elle résulte nettement de l'étirement et du déchirement des zones adhérent au substrat lorsque l'amibe se déplace, et n'est jamais portée par un bulbe collopodial. Les mêmes effilochures prennent naissance lors de la rétraction du cytoplasme au cours d'un changement de direction, ou encore lors de la séparation de deux cellules qui étaient juxtaposées. En effet, lorsque celles-ci se détachent l'une de l'autre, elles paraissent momentanément comme entrelacées par l'intermédiaire de ces filaments.

L'endoplasme renferme les organites et enclaves habituels chez les amibes.

■ Le Noyau.

Les trophozoïtes sont en principe uninucléés et le noyau présente la structure habituellement rencontrée chez les amibes libres, il est vésiculeux, avec un nucléole central. Il faut cependant faire quelques remarques à son sujet.

► Sa forme est souvent très allongée, étirée.

► L'ensemble du noyau et son nucléole se modifie avec une grande plasticité mais, au cours des déformations, le pourtour du nucléole ne reste pas forcément parallèle au contour de la membrane nucléaire, comme si chacun évoluait séparément (Cf Planche XX. n°193 p.217). Ces constatations suggèrent que la membrane nucléaire est soumise à des forces de traction s'exerçant de façon quasi permanente aux deux extrémités, ce qui confère au noyau son aspect allongé. Nous n'avons pourtant pas réussi à observer de "centrosphère" sur le vivant, en contraste de phase.

► En raison de l'importance du diamètre principal du noyau, le rapport

nucléo-cytoplasmique chez *Comandonia operculata* paraît plus élevé que chez la plupart de nos autres souches.

► A l'inverse, le nucléole devient proportionnellement réduit en fonction du grand axe du noyau : il ne représente effectivement que le tiers ou la moitié de la dimension principale de celui-ci.

■ Les Vacuoles contractiles.

Disséminées au hasard dans tout l'endoplasme, elles sont en grand nombre, au moins une dizaine. Elles atteignent des tailles très inégales, et fonctionnent de façon indépendante les unes des autres.

A la différence de ce que l'on observe chez d'autres amibes - *Vahlkampfiidae*, *Hartmannellidae* -, on ne retrouve pas, chez *Comandonia operculata*, un complexe vacuolaire d'emplacement déterminé.

■ Les Vacuoles digestives.

Les bactéries sont absorbées par la bordure ectoplasmique qui les englobe souvent au niveau d'une petite dépression. La bactérie ainsi capturée reste d'abord immobile, comme engluée au sein de l'ectoplasme. Une vacuole se constitue progressivement tout autour d'elle, paraissant résulter de l'afflux de nombreuses et très petites vésicules qui tourbillonnent à proximité de la proie bactérienne. La vacuole digestive, une fois formée, se trouve rapidement entraînée dans les mouvements de cyclose de l'endoplasme. Après un certain temps de déplacement dans le cytoplasme, la digestion de la bactérie se produit brutalement : elle disparaît au sein de la vacuole qui change d'aspect, devient moins réfringente, plus terne ; quelquefois des déchets restent visibles à l'intérieur.

Parfois, après l'englobement de la bactérie, la vacuole digestive ne se constitue pas, ou alors, malgré sa formation la digestion n'intervient pas : dans ces deux cas la bactérie sera finalement rejetée dans le milieu extérieur.

■ Morphologie kystique.

Comandonia operculata, isolée maintenant depuis plus de deux ans, s'enkyste très régulièrement après chaque repiquage, dans nos conditions de culture. La longévité des kystes ne nous paraît cependant pas exceptionnelle : elle nécessite à notre avis, un repiquage tous les deux

mois.

■ Les kystes offrent une grande diversité de formes mais constituent néanmoins un des éléments essentiels de la diagnose de *Comandonia operculata*. La majorité d'entre eux présente un contour polygonal plus ou moins net en raison d'angles peu marqués, mais, d'un kyste à l'autre, l'aspect n'est pratiquement jamais identique (Cf Planche XXI. n°211 & 212 p.221) : le pourtour est quelquefois franchement cabossé, ou devient même, dans des cas plus rares, très accidenté et festonné de façon irrégulière ; ailleurs, le kyste tend parfois vers une forme plus globuleuse. Ces différences morphologiques donnent à l'ensemble de la population kystique une grande hétérogénéité, perceptible dès les plus faibles grossissements (x 100).

■ En raison de cet aspect général très irrégulier, un examen trop sommaire peut induire en erreur un observateur peu averti et faire confondre ces kystes avec ceux d'*Acanthamoeba*. En fait, la confusion ne persiste pas longtemps si on pratique l'examen à un plus fort grossissement, car on ne retrouve jamais l'aspect le plus fréquent des kystes d'*Acanthamoeba*, c'est-à-dire la présence d'une membrane interne, rétractée à l'intérieur d'une seconde membrane constituant la paroi externe.

Chez *Comandonia operculata*, en contraste de phase la paroi kystique apparaît épaisse, et unique. Il ne nous a pas été possible de distinguer une double membrane en raison de la forte réfringence. Son existence ne peut être mise en évidence que grâce à des colorations au bleu Alcian (Pussard : communication personnelle).

La membrane externe apparaît alors mince et fragile, accolée de façon plus ou moins lâche à la membrane interne, beaucoup plus épaisse. A l'intérieur du kyste, l'emplacement du noyau se repère facilement grâce au nucléole, très dense et réfringent. On remarque en outre, l'existence d'une couronne périnucléaire à grains plus ou moins fins.

■ Le diamètre moyen des kystes, mesuré dans leur plus grande dimension, apparaît dans le Tableau XIII., ci-contre.

Tableau XIII. Diamètre moyen des kystes de *Comandonia operculata*.

	Kystes de 3 mois	Kystes de 1 mois
Diamètre moyen en μm	12,90	12,60
Ecart - type σ	$\sigma = 1,24$	$\sigma = 0,90$

■ Le mode de dékystement mérite tout particulièrement d'être signalé, car il s'effectue selon un processus qui, jusqu'à présent, n'a été décrit que chez *Acanthamoeba*.

L'amibe effectue en effet sa sortie à travers un ostiole, de la même manière que les *Acanthamoeba*, et non par une fente de déhiscence. Cet ostiole est parfaitement visible sur les membranes kystiques abandonnées, ou sur les kystes pleins après coloration. Il ménage toutefois, un passage plus large que celui des kystes d'*Acanthamoeba*. Comme chez ces derniers, on distingue à l'intérieur de la paroi kystique vide, en faisant varier la mise au point, un ou plusieurs opercules que l'amibe a arrachés avant d'effectuer sa sortie (Cf Planche XXI. n°213 & n°214 p.221).

Le dékystement par un ostiole, après déplacement de clapets de sortie, ne peut donc plus désormais, être considéré comme spécifique du seul genre *Acanthamoeba*.

■ Division.

■ Les trophozoïtes qui entrent en division perdent leur polarisation de déplacement, cessent toute déformation, et adoptent un contour parfaitement circulaire. Ils sont ainsi aisément repérables sur les préparations, même à l'aide d'un faible grossissement ($\times 100$) (Cf Planche XX. : n°194 & n°195 p. 217).

En dehors de cette immobilisation, la prophase se caractérise par la disparition lente du nucléole. Avant que son effacement ne s'achève, on remarque l'apparition de petits granules dans le suc nucléaire, à la périphérie du noyau (Cf Planche XX. n°195 - n°197 p.217).

Après la disparition totale du nucléole, ces grains deviennent de plus en plus distincts puis se confondent, pour former finalement une couronne prophasique (Cf Planche XX. n°198 p. 217).

L'évolution ultérieure de cette couronne, telle que nous avons pu la suivre sur le vivant, ne laisse aucun doute sur sa nature chromatienne. Cet anneau, d'apparence fine et grêle au début, va se rétracter sur lui-même et rétrécir. Les éléments qui le composent se désagrègent, produisant une masse de structure confuse et lâche qui s'organise peu à peu pour, finalement, donner naissance à la plaque équatoriale (Cf Planche XX. n°199 - n°201 p.217).

Ainsi, l'étude de *Comandonia operculata* permet de retrouver sur le vivant le déroulement de la prophase tel que certains auteurs (214) l'ont observé chez d'autres amibes, mais à partir de matériel fixé et coloré.

■ A la prométaphase la membrane nucléaire a complètement disparu et la plaque équatoriale se dessine, large et finement ondulée (Cf Planche XXI. n°202 p.221).

■ L'anaphase, difficile à percevoir au début, se déroule rapidement : les deux lots de chromosomes-fils, au cours de leur ascension polaire, présentent souvent une forme légèrement arquée en "accent circonflexe" (Cf Planche XXI. n°203 - n°207 p.221).

■ Au cours de la télophase, les plaques chromosomiques perdent de leur netteté mais demeurent néanmoins longtemps visibles, même pendant la cytodierèse, au point que celle-ci s'achèvera avant la reconstitution des noyaux-fils (Cf Planche XXI. n°208 - n°210 p.221).

■ La division de *Comandonia operculata* se rattache donc au type métamitotique, sans que nous ayons pu, à aucun moment, observer de centre cinétique sur le vivant.

Cette métamitose, qui peut paraître banale dans son déroulement, offre cependant une particularité remarquable puisqu'elle permet de suivre *in vivo* l'individualisation progressive de la chromatine dès la prophase, ainsi que son évolution ultérieure. Parmi toutes les souches que nous avons examinées, cette possibilité reste exceptionnelle, puisque nous

n'avons pu l'observer sur le vivant que dans deux cas : celui de Comandonia operculata et celui d'une autre souche d'aspect flabellulien.

Planche XX. : Souche LU₅c. : Comandonia operculata

.../

Planche XX.

Souche $LU_5c.$: Comandonia operculata.

Photographies n°190 à n°201 : Microphotographies prises sur le vivant, en contraste de phase.

Grossissement : x 1.500 (n°190 & n°192) ; x 945 les autres vues.

■ Photographies n°190 à n°192 : Amibes en déplacement présentant des échinopodes.

■ Photographie n°193 : Amibes moins actives.

Remarquer l'aspect étiré des noyaux et l'absence d'expansions filamenteuses.

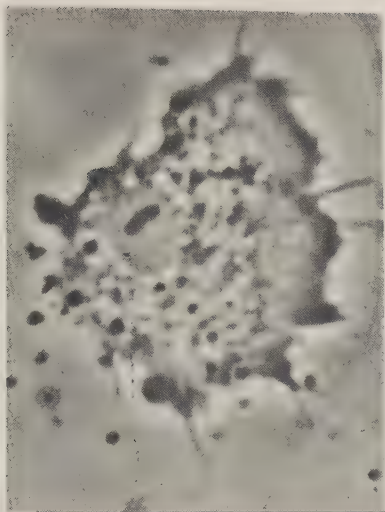
■ Photographies n°194 à n°200 : Stades prophasiques.

Disparition du nucléole et condensation progressive de la couronne chromatinienne qui donne ensuite naissance à la plaque équatoriale.

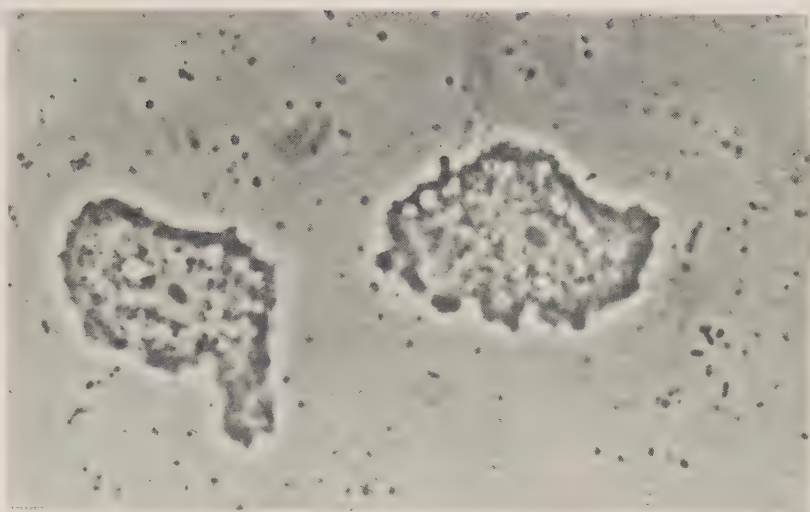
■ Photographie n°201 : Métaphase.

Légendes en regard des flèches :

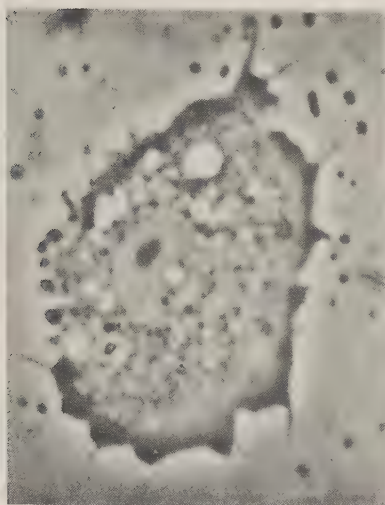
 = couronne prophasique



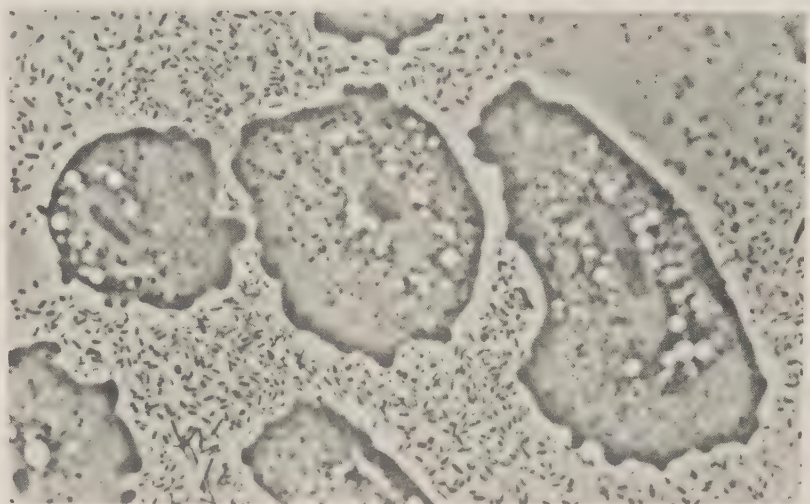
190



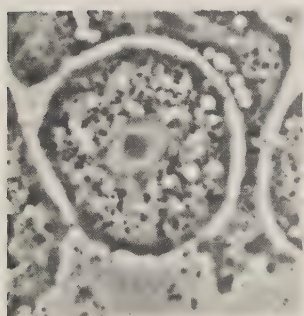
191



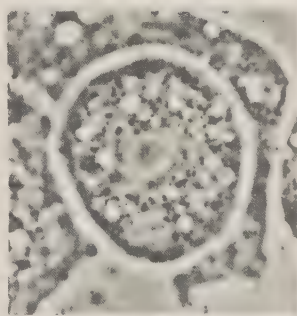
192



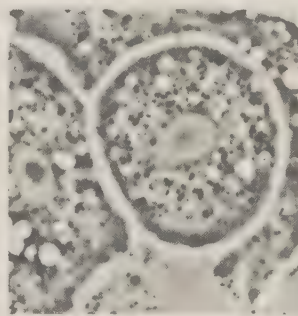
193



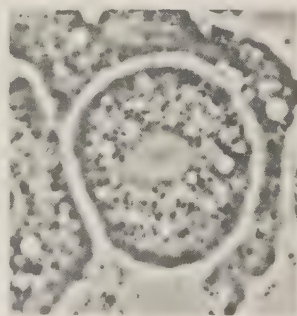
194



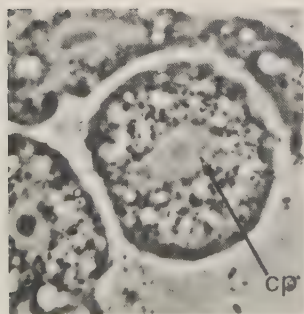
195



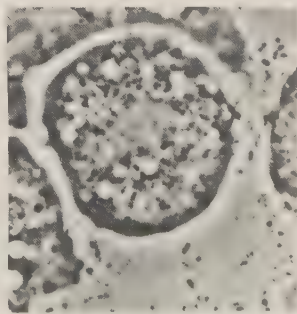
196



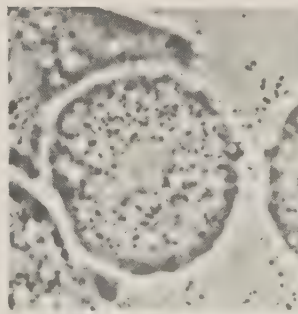
197



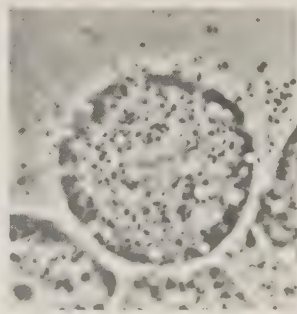
198



199



200



201

B. Discussion.

■ Page (159) a créé la nouvelle famille des *Echinamoebidae* pour des amibes plus ou moins étalées sur le substrat au cours du déplacement et caractérisées au niveau de l'ectoplasme par un nombre variable de pseudopodes finement éffilés, non anastomosés, quelquefois ramifiés.

Notre souche, qui présente une lame ectoplasmique très irrégulière et hérissée de fines projections en certains points, entrerait donc parfaitement dans le cadre de cette définition. Toutefois l'émission de ce type d'expansions, — échinopodes —, ne représente pas un caractère suffisamment spécifique. On les retrouve en effet chez *Acanthamoeba*, où toutes les transitions sont possibles entre les acanthopodes, en principe plus développés, plus larges, à extrémité émoussée, et les échinopodes plus courts, plus éffilés. Dans ce genre, la formation d'acanthopodes nous paraît donc indissociable de celle des échinopodes, et la distinction de ces deux types de projections est, en fait, singulièrement difficile à établir. En raison de l'étroite parenté qui existe entre ces deux types de pseudopodes Page place sa nouvelle famille au voisinage immédiat des *Acanthamoebidae*. Comme il pressent les difficultés que risque de poser, en pratique, la distinction de ces deux termes, il tente de préciser la définition de sa famille en ajoutant : "Les espèces connues forment des kystes mais sans endokyste polygonal ou étoilé ; pas de dékystement par déplacement d'un opercule". Page espère ainsi lever toute ambiguïté et différencier nettement les genres de la famille des *Echinamoebidae* du seul genre *Acanthamoeba* que renferme la famille des *Acanthamoebidae* : si des problèmes surgissent pour l'identification et le rattachement des formes végétatives, l'existence, ou l'absence de la structure typique au niveau des kystes, ainsi que le mode de dékystement si particulier d'*Acanthamoeba*, permettront aisément de trancher.

■ Mais cette définition des *Echinamoebidae* ne prévoit pas, en fait, l'existence possible d'espèces comme *Comandonia operculata*, qui occupent une position intermédiaire et assurent en quelque sorte la transition entre les deux familles.

En effet, en raison de son mode de dékystement, notre souche se trouve automatiquement exclue des *Echinamoebidae* par la définition restric-

Planche XXI.

Souche $LU_5c.$: Comandonia operculata (suite)

Photographies n°202 à n°210 : Microphotographies prises sur le vivant,
et n°212 à n°214 : en contraste de phase.

Grossissement : x 1.500

► La photographie n°211, microphotographie en contraste de phase après coloration à l'argent (T.Ag.r. ou Thiocarbohydrazide. argent réduit), au Grossissement x 1.000, nous a été transmise par M. Pussard.

■ Photographie n° 202 : Métaphase.

■ Photographies n° 203 à n° 207 : Anaphase.

■ Photographies n° 208 à n° 210 : Télaphase.

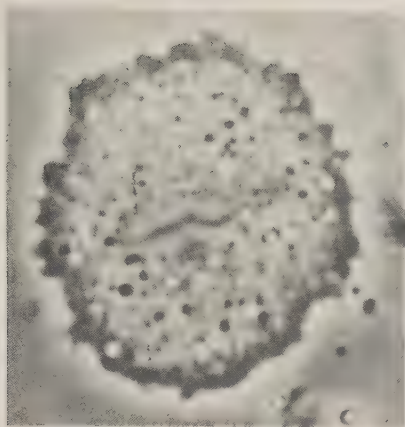
■ Photographie n° 211 : Kystes.

L'existence des ostioles est nettement mise en évidence après coloration à l'argent.

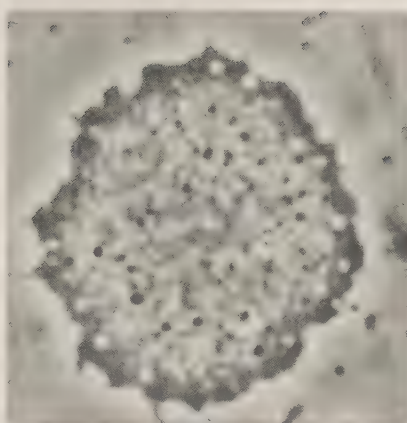
■ Photographie n° 212 : Kyste plein.

■ Photographies n° 213 & n° 214 : Kystes vides.

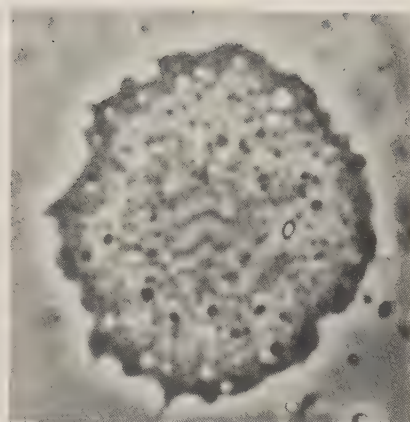
Remarquer la présence d'opercules à l'intérieur des kystes et l'existence des pores de sortie.



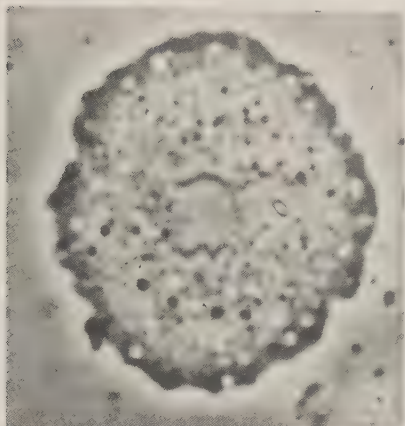
202



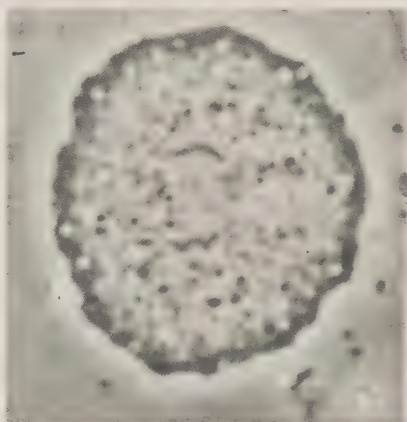
203



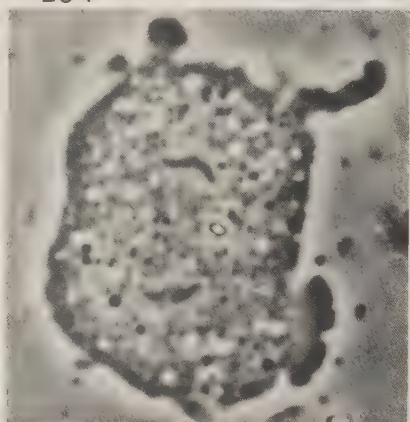
204



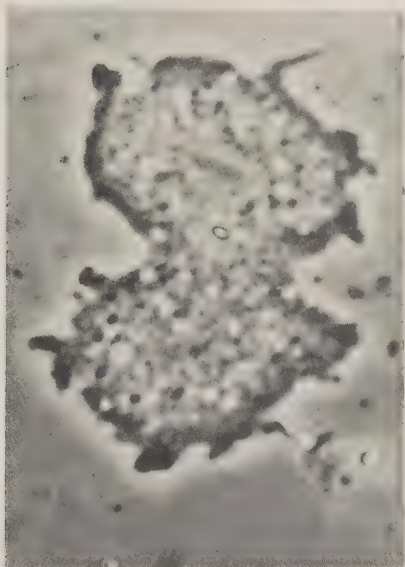
205



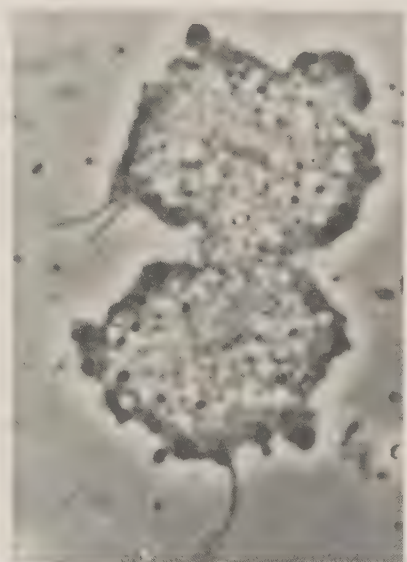
206



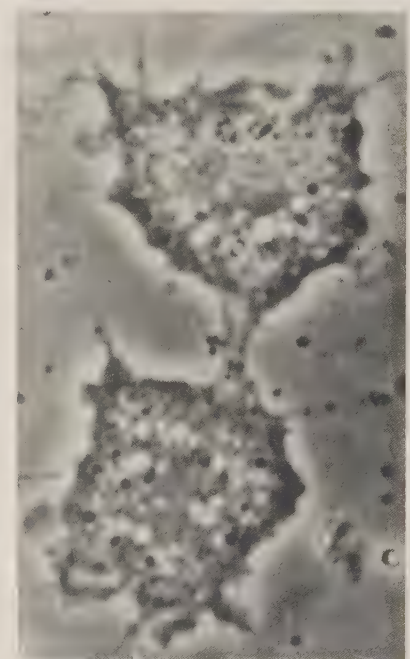
207



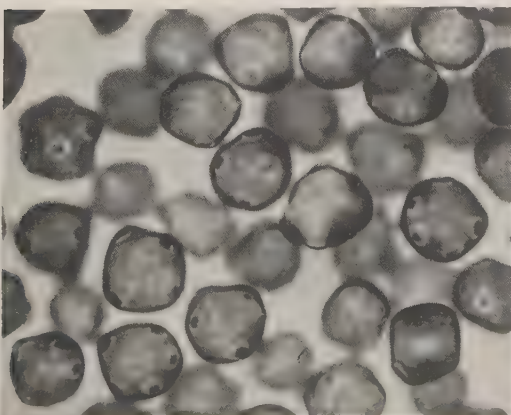
208



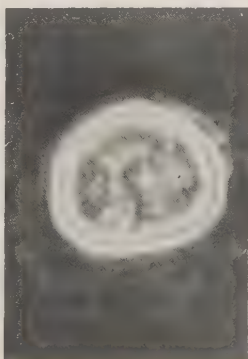
209



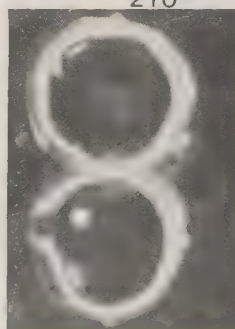
210



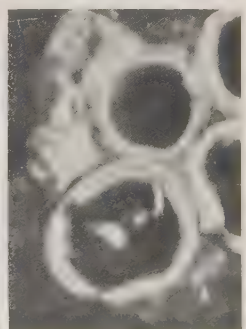
211



212



213



214

tive de Page.

■ De toute façon, même si l'on fait abstraction du mode de dékystement, aucun des trois genres décrits par Page dans cette famille des Echinamoebidae (159) ne convient pour notre souche.

■ Le genre Echinamoeba comprend deux espèces, *E. exundans* et *E. silvestris* de forme plutôt triangulaire.

La bordure ectoplasmique, irrégulière, porte des échinopodes en nombre variable, qui peuvent faire défaut à certains moment comme chez *Comandonia operculata*, mais, les faibles dimensions des trophozoïtes et des kystes, ainsi que l'aspect arrondi de ceux-ci, permettent d'éliminer ce dernier genre.

■ Le genre Stachyamoeba ne comprend qu'une seule espèce qui se rapproche sans doute plus de notre souche.

■ D'une part, par sa bordure irrégulière hérissée d'échinopodes qui prennent souvent naissance à l'extrémité de déformations ectoplasmiques triangulaires.

■ D'autre part, par sa propriété d'émettre éventuellement des pseudopodes lobés, hyalins, et dépourvus de fines projections, ainsi que nous l'avons mentionné également pour notre souche.

■ Cependant, le genre Stachyamoeba ne peut être retenu en raison de plusieurs points de divergence.

■ Le nucléole est morcelé en plusieurs endosomes pariétaux chez *S. lipophora*, alors qu'il n'existe classiquement qu'un seul nucléole central chez *Comandonia operculata*.

■ La division correspond chez *S. lipophora*, à une mésomitose - selon le sens donné à ce terme par Pussard - avec persistance de la membrane nucléaire jusqu'en fin d'anaphase, alors que nous avons constaté la disparition de celle-ci en fin de prophase.

■ Enfin, le kyste habituellement sphérique chez *S. lipophora*, est muni d'une membrane externe plissée, quelquefois même nettement mamelonnée. Certains d'entre ces kystes pourraient être confondus avec ceux que nous avons observés, mais Page précise qu'ils ne possèdent ni pores ni opercules chez les Echinamoebidae.

■ Le genre *Filamoeba*, rattaché par Page à la famille des *Echinamoebidae*, ne peut être réservé qu'à des amibes présentant des pseudopodes filamenteux beaucoup plus développés et qui tombent, alors, sous le sens du terme filopodes, ainsi que le reconnaît cet auteur.

■ A l'opposé, notre souche rappelle, par certains caractères, le genre *Acanthamoeba* (*Acanthamoebidae*).

■ Nous avons déjà souligné que l'émission d'échinopodes n'est pas spécifique, et que cette propriété rapproche plus notre souche du genre *Acanthamoeba* qu'elle ne l'en éloigne.

■ *Comandonia operculata* s'apparente également à ce genre par son mode de dékystement très particulier. La sortie à travers un ostiole après décollement d'un opercule encore visible dans le kyste abandonné, n'a jusqu'à présent été décrite que chez *Acanthamoeba*.

Cependant, ces points communs ne nous semblent pas suffisants pour faire de cette souche une nouvelle espèce d'*Acanthamoeba*.

Elle se distingue de ce genre par d'autres caractères, aussi bien au niveau des kystes que des formes végétatives.

■ La structure kystique peut apparaître, à première vue, proche de celle du genre *Acanthamoeba* puisqu'en plus du mode de dékystement identique, les colorations à l'argent et au bleu Alcian confirment la présence d'ostioles et même, permettent de révéler l'existence d'une deuxième membrane.

Mais l'organisation de ces deux enveloppes reste nettement différente de la structure observée chez la plupart des espèces d'*Acanthamoeba*. On ne peut jamais distinguer chez *Comandonia operculata*, la membrane interne rétractée à l'intérieur de la membrane externe, ni la réunion de ces deux membranes au niveau des ostioles. Cette différence morphologique appelle certaines réserves car, nous l'avons déjà vu, une tendance à la simplification de la forme du kyste, ainsi qu'à l'accolement des deux membranes, s'amorce nettement chez certaines espèces d'*Acanthamoeba* telles que *A. culbertsoni*, *A. palestinesis* et surtout *A. lenticulata* et *A. pustulosa*. Chez *Comandonia operculata* toutefois, la deuxième membrane reste très mince et fragile, elle demeure invisible en contraste de phase ; elle

ne paraît pas participer directement à la constitution des ostioles, ce qui demanderait à être confirmé par une étude en microscopie électronique (Pussard, communication personnelle). La membrane externe résulte plus vraisemblablement de la persistance, autour du kyste, de la couche mucopolyssacharidique du trophozoïte, que de l'élaboration d'une véritable membrane par la cellule en voie d'enkystement.

■ Les formes végétatives permettent également d'établir d'importantes distinctions. Ce sont, d'une part l'aspect fréquemment étiré du noyau malgré l'absence apparente de "centrosphères" et, d'autre part, la répartition différente des vacuoles contractiles disséminées au hasard dans tout l'endoplasme, alors qu'il existe un territoire pulsatile d'emplacement déterminé chez *Acanthamoeba*.

■ Enfin, l'observation dynamique de la mitose sur le vivant permet de relever quelques particularités telles que le phénomène de condensation chromatinienne à la prophase et la mise en place de la plaque équatoriale qui, le plus souvent, *in vivo*, passent inaperçus chez *Acanthamoeba*.

Toutes ces raisons nous incitent à écarter le genre *Acanthamoeba*, et justifient la création du nouveau genre *Comandonia*, qui se rattache par ses affinités à la famille des *Acanthamoebidae*.

Comandonia operculata est l'espèce-type et nous en proposons la diagnose suivante.

Genre : *Comandonia* _____

- ★ Amibes bien étalées sur le substrat.
- ★ Lamé ectoplasmique peu développée, irrégulière, donnant naissance à des expansions épineuses au cours de ses déformations.
L'émission de pseudopodes lobés reste toutefois fréquente.
- ★ Division par métamitose.
- ★ Morphologie kystique très variable, de contour souvent irrégulier, polyédrique, voire même quelquefois mamelonnée.
Kyste à membrane interne très nette et enveloppe externe très fine et peu visible.
- ★ Dékystement par un ostiole après déplacement d'un opercule.

_____ Espèce-type : *Comandonia operculata* .../_____

► Espèce-type : *Comandonia operculata*.

- * Elle présente les caractères du Genre.
- * Dimension : $40\mu\text{m}$ en moyenne dans sa plus grande dimension.
- * Noyau d'apparence souvent très allongée, contenant un unique nucléole central.
- * Vacuoles contractiles disséminées dans tout l'endoplasme.
- * Touffe de filaments uroïdaux fréquente et bien développée.
- * Division par métamitose.
 - Condensation prophasique de la chromatine sous forme d'une couronne et organisation de la plaque équatoriale visible sur le vivant.
- * Kyste de $12,7\mu\text{m}$ en moyenne.

Conclusions

La découverte relativement récente chez l'homme, de cas de méningo-encéphalite amibienne primitive dus aux amibes libres, nous a amené à étudier les principales caractéristiques de ce syndrome, à préciser les espèces en cause, et même à entrevoir un élargissement possible de leur rôle pathogène.

Les principales méthodes utilisées dans l'étude de ces protozoaires sont passées en revue. En raison de l'extrême diversité des souches isolées, - 85 au total -, nous nous sommes efforcé de réaliser un essai d'identification à partir de l'étude microscopique en contraste de phase. Celle-ci permet d'aboutir sur ces cellules à une observation exhaustive de leurs caractères morphologiques et biologiques. Elle demanderait cependant à être complétée par des recherches biochimiques et immunologiques.

L'ensemble de ces méthodes, néanmoins, n'a pas encore abouti à une systématique cohérente des amibes.

Notre travail a permis d'établir la présence quasi constante d'amibes libres dans les eaux de piscines, ainsi que la fréquence des principaux genres rencontrés, en particulier la rareté relative de *Naegleria*, la plus souvent identifiée chez l'homme. Cette difficulté à isoler des souches de *Naegleria* mériterait de nouvelles recherches.

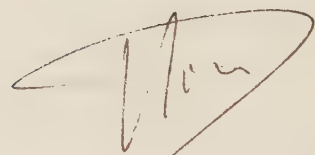
Nous avons testé la pathogénécité éventuelle des deux genres essentiellement incriminés dans la littérature : *Naegleria* et *Acanthamoeba*.

Aucune de nos souches de *Naegleria* n'est pathogène. Par contre une proportion élevée de nos souches d'*Acanthamoeba*, huit sur treize, s'avère pathogène pour la Souris, après instillation nasale, avec atteinte du cerveau et même généralisation dans l'organisme.

Il serait intéressant d'élargir cette étude de la pathogénécité aux autres genres d'amibes libres, ce qui permettrait peut-être d'obtenir des résultats tout aussi surprenants.

Par ailleurs, nous nous sommes efforcé de souligner à plusieurs reprises, lors de l'étude microscopique de différents genres comme Vahlkampfia, Vannella, Vexillifera, Nuclearia, tout l'intérêt présenté par un examen attentif des caractères mitotiques, souvent très diversifiés chez les rhizopodes. Il conviendrait donc de continuer dans cette voie et d'attacher désormais plus d'importance au phénomène de la division chez les amibes, sans toutefois négliger leurs autres caractères.

Enfin, plusieurs espèces nouvelles semblent avoir été isolées et l'une d'elles, Comandonia operculata n.g., n.sp. (Acanthamoebidae), fait l'objet d'une description originale dans la nomenclature. Les autres seront décrites dans des publications ultérieures.



LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE :
Professeur J. Coudert

VU, LE DIRECTEUR DE L'U.E.R. DES
SCIENCES PHARMACEUTIQUES,
Professeur L. Oddoux



VU ET PERMIS D'IMPRIMER
LYON, LE 4 novembre 1976

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ
CLAUDE BERNARD,



Professeur D. Germain

Annexe I.

Milieu de Cerva :

Bacto-casitone (DIFCO)	20 g
Sérum de veau (ou de poulain)	100 ml
Pénicilline	500.000 U I
Streptomycine	50.000 μ g
Eau bidistillée	900 ml

=====

Milieu CGVS (Willaert) :

Bacto-casitone (DIFCO)	20 g
Glucose	1 g
Acide folique	2 mg
Biotine	20 μ g
Rutine	5 mg
Sérum de veau	100 ml
Pénicilline	500.000 U I
Streptomycine	50.000 μ g
Eau bidistillée	900 ml

=====

Milieu CFA de Fulton :

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0,68 g
$\text{PO}_4\text{HNa}_2, 12\text{H}_2\text{O}$	1,8 g
Glucose	6 g
Protéose-peptone	10 g
Yeast extract	5 g
Sérum de veau	100 ml
Eau distillée	900 ml

=====

Solution de Winogradsky :

$\text{P O}_4 \text{ H K}_2$	5 g
$\text{S O}_4 \text{ Mg}$	2,5 g
Na Cl	2,5 g
$(\text{S O}_4)_3 \text{ Fe}_2$	0,05 g
$\text{S O}_4 \text{ Mn}$	0,05 g
Eau distillée	1.000 ml

Amener le pH à 7,2 avec $\text{KOH}^{\text{N}/10}$
 Stériliser 20 mn à 120°C.

=====

Gélose - Winogradsky :

Gélose	15 g
Solution de Winogradsky	50 ml
Eau distillée	1.000 ml

Ajuster le pH à 7,2.

Bibliographie

1. Adam, K.M.G.
The growth of *Acanthamoeba* sp. in a chemically defined medium.
J.Gen.Microbiol., 1959, 21 : 519-529
2. Adam, K.M.G.
A comparative study of hartmannellid amoebae.
J.Protozool., 1964, 11 : 423-430
3. Adam, K.M.G., Blewett, D.A.
Carbohydrate utilization by the soil amoeba *Hartmannella castellanii*
J.Protozool., 1967, 14 : 277-282
4. Adam, K.M.G., Blewett, D.A., Flamm, W.G.
The DNA of *Acanthamoeba* spp. : a method for extraction and its
characterization.
J.Protozool., 1969, 16 : 6-12
5. Anderson, K., Jamieson, A.
Primary amoebic meningoencephalitis.
Lancet, 1972, I. : 902-903
6. Anderson, K., Jamieson, A.
Primary amoebic meningoencephalitis.
Lancet, 1972, II. : 379
7. Anderson, K., Jamieson, A.
Agglutination test for the investigation of the genus *Naegleria*.
Pathology, 1972, 4 : 273-278
8. Apley, J., Clarke, S.K.R., Roome, A.P., Sandri, S.A., Saygi, G.,
Silk, B., Warhurst, D.C.
Primary amoebic meningoencephalitis in Britain.
Brit.Med.J., 1970, 1 : 596-599
9. Armstrong, J., Pereira, M.
Identification of "Ryan virus" as an amoeba of the genus
Hartmannella.
Brit.Med.J., 1967, 1 : 212-214

.../

10. Artari, A.
Morphologische und biologische Studien über *Nuclearia delicatula* Cienk.
Zool.Anz., 1889, 12 : 408-416
11. Ayers, K.M., Billups, L.H., Garner, F.M.
Acanthamoebiasis in a dog.
Vet.Pathol., 1972, 9 : 221-226
12. Balamuth, W.
Nutritional studies on axenic cultures of *Naegleria gruberi*.
J.Protozool., 1964, 11 (Suppl.) : 19-20
13. Balamuth, W., Kawakami, T.
Antigenic relationship among selected hartmannellid amoeboid-flagellates.
J.Protozool., 1967, 14 (Suppl.) : 31
14. Band, R.N.
Nutritional and related biological studies on the free-living soil amoeba, *Hartmannella rhysodes*.
J.Gen.Microbiol., 1959, 21 : 80-95
15. Bhagwande, S.B., Carter, R.F., Naik, B.S., Levitt, D.
A case of hartmannellid amoebic meningoencephalitis in Zambia.
Amer.J.Clin.Path., 1974, 63 : 483-492
16. Belar, K.
Der Formwechsel der Protistenkerne.
Coll.Ergbn. und Fortschr.Zool., 1926, 6 : 235-654
G.Fischer, éditeurs, Iéna.
17. Blanc-Brude, R., Skreb, Y., Dragesco, J.
Sur la biologie de *Nuclearia delicatula* (Cienkowski).
Bull.Micro.Appl., 1955, (2) V. : 113-117
18. Bovee, E.C.
A proposed dichotomy of the genus *Vexillifera* Schaeffer 1925. based on types of waving pseudopodes.
Proc.Amer.Soc.Protozool., 1951, 2 : 4
19. Bovee, E.C.
Morphological identification of free-living Amoebozoa.
Proc.Iowa Acad.Sci., 1953, 60 : 599-615

.../

20. Bovee, E.C.
Some observations on a marine amoeba of intertidal zones,
Vexillifera telmathalassa, n.sp.
J.Protozool., 1956, 3 : 155-158
21. Bovee, E.C.
A small amoeba of fresh-water lakes and ponds, *Mayorella*
cultura, nov.sp.
Trans.Amer.Microsc.Soc., 1961, 80 : 54-62
22. Bovee, E.C.
An emendation of the amoeba genus *Flabellula* and
a description of *Vannella*, gen.nov.
Trans.Amer.Microsc.Soc., 1965, 84 : 217-227
23. Bovee, E.C., Jahn, T.L.
Mechanisms of movement in taxonomy of Sarcodina.
III. Orders, Suborders, Families and Subfamilies,
in the Superorder Lobida.
Syst.Zool., 1966, 15 : 229-240
24. Bovee, E.C.
The lobose amoebas.
I. A key to the Suborder Conopodina Bovee and Jahn 1966,
and descriptions of thirteen new or little-known *Mayorella* species.
Arch.Protistenk., 1970, 112 : 178-227
25. Bowers, B., Korn, E.D.
The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*.
I. The trophozoïte.
J.Cell.Biol., 1968, 39 : 95-111
26. Butt, C.G.
Primary amoebic meningoencephalitis.
New Engl.J.Med., 1966, 274 : 1473-1476
27. Butt, C.G., Baro, C., Knorr, R.W.
Naegleria (sp.) identified in amoebic encephalitis.
Amer.J.Clin.Path., 1968, 50 : 568-574
28. Cailleau, R.
Cultures d'*Acanthamoeba castellanii* en eau peptonée.
Action sur les glucides.
C R. Soc.Biol., 1933, 114 : 474-476

29. Callicott, J.H.
 Amebic meningoencephalitis due to free-living amoebas of the
 Hartmannella (Acanthamoeba) - Naegleria group.
 Amer.J.Clin.Path., 1968, 49 : 84-91

30. Callicott, J.H., Jones, M.M., Nelson, E.C., Dos Santos, J.C.
 Utz, J.P., Duma, R.J., Morris, J.V.
 Meningoencephalitis due to free-living amoeba.
 J.Amer.Med.Assoc., 1968, 206 : 579-582

31. Carosi, G.
 Etude comparative de l'ultrastructure d'Entamoeba moshkovskii,
 des amibes parasites du genre Entamoeba et des amibes "free-
 living" du groupe Hartmannella - Naegleria.
 CR. Coll.Intern. sur la Méningoencéphalite amibienne primitive
 et les amibes libres, Anvers, 1973, pp. 41-53
 Libr.Prince Léopold, Anvers, B.2000, 1974

32. Carter, R.F.
 Primary amoebic meningoencephalitis : clinical, pathological
 and epidemiological features of six fatal cases.
 J.Path.Bacteriol., 1968, 96 : 1-25

33. Carter, R.F.
 Sensitivity to Amphotericin B of a Naegleria sp. isolated from
 a case of primary amoebic meningoencephalitis.
 J.Clin.Path., 1969, 22 : 470-474

34. Carter, R.F.
 Description of a Naegleria isolated from two cases of primary
 amoebic meningoencephalitis, and of the experimental pathological
 changes induced by it.
 J.Pathol., 1970, 100 : 217-244

35. Carter, R.F.
 Primary amoebic meningoencephalitis. An appraisal of present
 knowledge.
 Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg., 1972, 66 : 193-213

36. Cash, J.
 On some new and little-known british fresh-water Rhizopoda.
 Linn.Soc.J.Zool., 1904, XXIX : 218-225

37. Cash, J.
 British fresh-water Rhizopoda.
 Roy.Soc., publisher, London, 1905, I. : 85-93

38. Cerva, L.
Use of fluorescent-antibody techniques to identify pathogenic *Hartmannella (castellanii)* in tissue of experimental animals.
Folia Parasitol., 1966, 13 : 328-331
39. Cerva, L.
Immunological studies on hartmannellid amoebae.
Folia Parasitol., 1967, 14 : 19-25
40. Cerva, L.
Intracerebral inoculation of experimental animals in pathogenetical studies of *Hartmannella castellanii*.
Folia Parasitol., 1967, 14 : 171-175
41. Cerva, L.
Intranasal, intrapulmonary, and intracardial inoculation of experimental animals with *Hartmannella castellanii*.
Folia Parasitol., 1967, 14 : 207-215
42. Cerva, L., Novak, K.
Amoebic meningoencephalitis : sixteen fatalities.
Science, 1968, 160 : 92
43. Cerva, L., Novak, K., Culbertson, C.G.
An outbreak of acute fatal amebic meningoencephalitis.
Amer.J.Epidemiol., 1968, 88 : 436-444
44. Cerva, L., Zimak, V., Novak, K.
Amoebic meningoencephalitis : a new amoeba isolate.
Science, 1969, 163 : 575-576
45. Cerva, L.
Amoebic meningoencephalitis : axenic cultures of *Naegleria*.
Science, 1969, 163 : 576
46. Cerva, L. Ferdinandova, M., Novak, K., Ptackova, V., Schrottenbaum, M., Zimak, V.
Meningoencephalitis durch *Amoebida Naegleriidae*. Einer weiteren Fall in der Tchechoslowakei. Isolierung des Erregers.
Münch.med.Wschr., 1969, 111 : 2090-2094
47. Cerva, L.
Comparative morphology of three pathogenic strains of *Naegleria gruberi*.
Folia Parasitol., 1970, 17 : 127-133

48. Cerva, L.
Studies of limax amoebae in a swimming pool.
Hydrobiologia, 1971, 38 : 141-161
49. Cerva, L.
Experimental infection of laboratory animals by the pathogenic
Naegleria gruberi strain Vitek.
Folia Parasitol., 1971, 18 : 171-176
50. Cerva, L., Serbus, C., Skocil, V.
Isolation of "limax" amoebae from the nasal mucosa of man.
Folia Parasitol., 1973, 20 : 97-103
51. Cerva, L., Kramar, J.
Antigenic relationships among several limax amoebae isolates,
assessed with the indirect fluorescent-antibody test (IFAT).
Folia Parasitol., 1973, 20 : 113-118
52. Cerva, L., Huldt, G.
Limax amoebae in five swimming-pools in Stockholm.
Folia Parasitol., 1974, 21 : 71-75
53. Chang, S.L.
Cultural, cytological and ecological observations of
the amoeba stage of *Naegleria gruberi*.
J.Gen.Microbiol., 1958, 18 : 565-578
54. Chang, S.L.
Small free-living amoebas : cultivation, quantitation, identific-
-ation, classification, pathogenesis and resistance.
Current Topics in Comparative Pathology,
Academic Press Inc., New York / London, 1971, pp. 201-254
55. Chatton, E.
Essai sur la structure du noyau et la mitose chez les Amoebiens.
Faits et théories.
Arch.Zool.Expér.Génér., 1910, 45 : 267-337
56. Chatton, E., Lalung-Bonnaire
Amoeba limax (Vahlkampffia, n.gen.) dans l'intestin humain, etc.
Bull.Soc.Path.Exot., 1912, 5 : 135-143
57. Chatton, E.
Classe de Lobosa Leidy 1879, ordre des Amoebiens nus ou Amoebae.
In : P. Grassé : "Traité de Zoologie" I. Protozoaires, pp.5-91
Masson & Co, édit., Paris, 1953, 1.160 pages.

58. Cheng, T.C.
Hartmannella tahitiensis sp.n., an amoeba associated with mass mortalities of the oyster Crassostrea commercialis in Tahiti, French Polynesia.
J.Invert.Path., 1970, 15 : 405-419
59. Cienkowski, L.
Beiträge zur Kenntnis der Monaden.
Archiv.Mikrosk.Anat., 1865, 1 : 203-232
60. Cienkowski, L.
Über einige Rhizopoden und Verwandte Organismen.
Arch.Mikrosk.Anat., 1876, 12 : 15-50
61. Comandon, J., De Fonbrune, P.
Observations sur une amibe.
Ann.Physiol., 1935, 11 : 1004-1007
62. Culbertson, C.G.
Acanthamoeba : observations on animal pathogenicity.
Science, 1958, 127 : 1506
63. Culbertson, C.G., Smith, J.W., Cohen, H.K., Minner, J.R.
Experimental infection of mice and monkeys by Acanthamoeba.
Amer.J.Path., 1959, 35 : 185-197
64. Culbertson, C.G., Ensminger, P.W., Overton, W.M.
The isolation of additional strains of pathogenic Hartmannella sp. (Acanthamoeba). Proposed culture method for application to biological material.
Amer.J.Clin.Path., 1965, 43 : 383-387
65. Culbertson, C.G., Holmes, D.H., Overton, W.M.
Hartmannella castellanii (Acanthamoeba sp.) : preliminary report on chemotherapy.
Amer.J.Clin.Path., 1965, 43 : 361-364
66. Culbertson, C.G., Ensminger, P.W., Overton, W.M.
Hartmannella (Acanthamoeba) : experimental chronic granulomatous brain infections produced by new isolates of low virulence.
Amer.J.Clin.Path., 1966, 46 : 305-314
67. Culbertson, C.G., Ensminger, P.W., Overton, W.M.
Pathogenic Naegleria sp. : study of a strain isolated from human cerebrospinal fluid.
J.Protozool., 1968, 15 (2) : 353-363

.../

68. Culbertson, C.G.
The pathogenicity of soil amoebas.
Annual Rev.Microbiol., 1971, 25 : 231-254
69. Culbertson, C.G., Ensminger, P.W., Overton, W.M.
Amebic cellulocutaneous invasion by Naegleria aerobia, with generalised visceral lesions, after subcutaneous inoculation.
Amer.J.Clin.Path., 1972, 57 : 375-386
70. Das, S.R., Singh, B.N.
Disease potential of free-living amoebae : virulence and chemotherapy of free-living amoebae.
J.Parasitol., 1970, 56, (4 Sect.II,Pt 1) : 67
71. Das, S.R., Willaert, E., Jadin, J.B.
Studies on mitotic division in Naegleria jadini.
Ann.Soc.belge Méd.trop., 1974, 54 : 141-146
72. Deflandre, G.
Ordre des Aconchulina De Saedeleer : Athalamia Haeckel.
In : P. Grassé : "Traité de Zoologie" I. Protozoaires, 2. : pp.92-96
Masson & Co, édit., Paris, 1953, 1.160 pages.
73. Derreumeaux, A.L., Jadin, J.B., Willaert, E., Moret, R.
Action du chlore sur les amibes de l'eau.
C.R. Coll.Intern.sur la Méningoencéphalite amibienne primitive et les Amibes libres, Anvers, 1973, pp.191-204
Libr.Prince Léopold, Anvers, B 2000, 1974
74. Desmet-Paix, L., Fisch-Thiébaud, C.
La présence d'amibes dans les piscines couvertes.
Note d'orientation.
Labor.Intercommunal Chimie et Bactériol., Bruxelles, 1975
75. Deutsch, K.
The mitosis of Hartmannella astronyxis : an electron microscope study
Monatsber Deutsch.Akad.Wiss., Berlin, 1960, 2 (3-4) : 205-210
76. Dingle, A., Fulton, C.
Development of the flagellar apparatus of Naegleria.
J.Cell.Biol., 1966, 31 : 43-54
- 76 bis. Dobell, C.
Cytological studies on three species of amoeba : A.lacertae Hartmann, A.glebae, n.sp., A.fluvialis, n.sp.
Arch.Protistenk., 1914, 34: 139-189

77. Dos Santos, J.N.G.
Fatal primary amebic meningoencephalitis.
A retrospective study in Richmond, Virginia.
Amer.J.Clin.Path., 1970, 54 : 737-742
78. Duma, R.J., Ferrell, H.W., Nelson, E., Jones, M.
Primary amebic meningoencephalitis.
New Engl.J.Med., 1969, 281 : 1315-1323
79. Duma, R.J.
In vitro susceptibility of pathogenic *Naegleria gruberi*
to Amphotericin B
Antimicrob.Agents Chemoter., 1970, 10 : 109-111
80. Duma, R.J., Rosenblum, W., Mac Gehee, R.F., Jones, M., Nelson, E.C.
Primary amebic encephalitis caused by *Naegleria* : two new cases
of response to Amphotericin B and a review.
Ann.Intern.Med., 1971, 74 : 923-931
81. Duma, R.J.
Primary amebic meningoencephalitis.
C R. Crit.Rev.Clin.Labor.Sci., 1972, 3 : 163-192
82. Dunnebacke, T., Schuster, F.L.
Infectious agent from a free-living soil amoeba, *Naegleria gruberi*.
Science, 1971, 174 : 516-518
83. Dwivedi, J., Singh, B.N.
Pulmonary lesions in an Indian buffalo, associated with *Acanthamoeba* sp.
Indian J.Microbiology, 1965, 5 : 31-34
84. Eldridge, A., Tobin, J.
Ryan virus.
Brit.Med.J., 1967, 1 : 299
85. Elson, C., Geyer, R.P., Chang, R.S.
A lecithinase from the amoeba *Hartmannella rhysodes*.
J.Protozool., 1970, 17 : 440-445
86. Fowler, M., Carter, R.F.
Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp. :
a preliminary report.
Brit.Med.J., 1965, 2 : 740-742

.../

87. Frank, W., Bosch, I.
Isolierung von Amöben des Typs Hartmannella - Acanthamoeba und Naegleria aus Kaltblütern.
Z.Parasitenk., 1972, 40 : 139-150
88. Fulton, C.
Amoeb-flagellates as research-partners : the laboratory biology of Naegleria and Tetramitus.
Meth.Cell.Physiol., 1970, 4 : 341-476
89. Fulton, C., Dingle, A.D.
Basal bodies but not centrioles in Naegleria.
J.Cell.Biol., 1971, 51 : 826-836
90. Glaser, H.
Untersuchungen über die Teilung einiger Amöben, zugleich ein Beitrag zur Phylogenie des Centrosoms.
Arch.Protistenk., 1912, 25 : 27-152
91. Goodfellow, L.P., Belcher, J.H., Page, F.C.
A light and electron microscopical study of Sappinia diploidea, a sexual amoeba.
Protistologica, 1974, 10 : 207-216
92. Grell, K.G., Benwitz, G.
Ultrastruktur mariner Amöben.
I. Paramoeba eilhardi Schaudinn.
Arch.Protistenk., 1970, 112 : 119-137
93. Griffin, J.L.
Temperature tolerance of pathogenic and non pathogenic free-living amoebas.
Science, (USA), 1972, 178 : 869-870
94. Griffiths, A.J., Hughes, D.E.
Starvation and encystment of a soil amoeba Hartmannella castellanii
J.Protozool., 1968, 15 : 673-677
95. Griffiths, A.J., Hughes, D.E.
The physiology of encystment of Hartmannella castellanii.
J.Protozool., 1969, 16 : 93-99
96. Hermanne, J., Jadin, J.B., Martin, J.
Méningoencéphalite amibienne primitive en Belgique : à propos de deux cas.
Ann.Pediat., 1972, 19 : 425-436

97. Hermanne, J., Jadin, J.B., Martin, J.J., Willaert, E.
 La méningoencéphalite amibienne primitive : considérations
 à propos des cas belges.
 Rev.Prat., Paris, 1974, 24 : 1241-1253

98. Hollande, A.
 Contribution à l'étude morphologique et cytologique
 des genres *Blomyxa* et *Cercobodo*. Description de deux espèces
 coprophiles nouvelles.
 Arch.Zool.Exp.Gén., 1942, 82 (N,R) : 119-128

99. Hollande, A.
 Etude cytologique et biologique de quelques flagellés libres.
 Arch.Zool.Exp.Gén., 1942, 83 : 1-268

100. Honiberg, B.M., Balamuth, W., Bovee, E.C., Corliss, J.D.,
 Gojdics, M., Hall, R.P., Kudo, R.R., Levine, N.D., Loeblich, A.R.,
 Weiser, J., Wenrich, D.H.
 A revised classification of the Phylum Protozoa.
 J.Protozool., 1964, 11 : 7-20

101. Houssay, D., Prenant, M.
Thecamoeba sphaeronucleolus : données physiologiques et études
 morphologiques en microscopie optique et électronique.
 Arch.Protistenk., 1970, 112 : 228-251

102. Jadin, J.B., Hermanne, J., Robijn, G., Willaert, E.
 Trois cas de méningoencéphalite amibienne primitive en Europe
 occidentale, à Anvers.
 Bull.Acad.Nat.Méd., Paris, 1971, 155 : 232-238

103. Jadin, J.B., Hermanne, J., Robijn, G., Willaert, E., Van Maercke,
 Stevens, W.
 Trois cas de méningoencéphalite amibienne primitive
 observés à Anvers (Belgique).
 Ann.Soc.belge Méd.trop., 1971, 51 : 255-266

104. Jadin, J.B., Willaert, E.
 Trois cas de méningoencéphalite amibienne primitive à *Naegleria*
gruberi, observés à Anvers (Belgique).
 Protistologica, 1972, 8 : 95-100

105. Jadin, J.B., Willaert, E.
 Au sujet de la dispersion des amibes du groupe limax.
 Protistologica, 1972, 8 : 505-508

106. Jadin, J.B., Willaert, E., Compère, F.
De la nécessité du contrôle biologique des eaux potables.
Bull.Acad.Nat.Méd., Paris, 1972, 156 : 520-526
107. Jadin, J.B.
De la méningoencéphalite amibienne et du pouvoir pathogène
des amibes limax.
Ann.Biol., 1973, 12 : 305-342
108. Jadin, J.B., Willaert, E., Hermanne, J.
Présence d'amibes limax dans l'intestin de l'homme et des animaux.
Bull.Acad.Roy.Sci.Outre-Mer, 1973, 3 : 520-526
109. Jadin, J.B.
Hypothèses au sujet de l'adaptation des amibes du groupe limax
à l'homme et aux animaux.
Ann.Parasitol., 1973, 48 : 199-204
110. Jadin, J.B.
De la dispersion et du cycle des amibes libres.
Ann.Soc.belge Méd.trop., 1974, 54 : 371-385
111. Jadin, J.B.
Les amibes dans les eaux.
Path.Biol., 1974, 22 : 81-87
112. Jadin, J.B.
De la méningoencéphalite amibienne primitive
et du pouvoir pathogène des amibes de l'eau.
Bull.Acad.Méd. belge, 1974, 129 : 439-466
113. Jadin, J.B.
Amibes limax vecteurs possibles des mycobactéries
et de Mycobacterium leprae.
Acta Leprologica, 1975, 59 & 60 : 57-67
114. Jadin, J.M., Eschbach, H.L., Verheyen, F., Willaert, E.
Etudes comparatives des kystes de Naegleria et Acanthamoeba.
Ann.Soc. Belge Méd.trop., 1974, 54 : 259-264
115. Jager, B.V., Stamm, W.P.
Brain abscesses caused by free-living amoebae probably
of the genus Hartmannella in a patient with Hodgkin's disease.
Lancet, 1972, pp. 1343-1345

116. Jakovljevič, R., Talis, B.
Recovery of a hartmannellid amoeba in the purulent discharge from a human ear.
J.Protozool., 1969, 16 (Suppl.) : 36
117. Jamieson, A.
The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in South Australia.
Progr.Protozool., (Clermont-Ferrand), 1973, p.198
118. Jamieson, A.
Effect of Clotrimazole* on Naegleria fowleri.
J.Clin.Path., 1975, 28 : 446-449
119. Jones, P.
Cité dans : (137 : Nagington, J. & Coll.
120. Kasprzak, W., Mazur, T.
Free-living amoeba isolated from waters frequented by people in the vicinity of Poznan, Poland.
Experimental studies in mice on the pathogenicity of the isolates.
Z.Tropen Med.Parasit., 1972, 23 : 391-398
121. Kasprzak, W., Mazur, T., Rucka, A.
Studies on pathogenic strains of free-living amoebas isolated from lakes in Poland.
C R. Coll.Intern. sur la Méningoencéphalite amibienne primitive et les Amibes libres, Anvers, 1973, pp. 127-133
Libr.Prince Léopold, Anvers, B 2000, 1974
122. Kingston, D., Warhurst, D.C.
Isolation of amoebas from the air.
J.Med.Microbiol., 1969, 2 : 27-36
123. Lamy, L., Fromentin, M.
Intérêt particulier de la culture pour la mise en évidence des amibes libres susceptibles de s'installer chez l'homme et de devenir pathogènes.
C R. Acad.Sci., 1973, 277 (D)(13) : 1205-1207 (6 réf.)
124. Lastovica, A.J.
Scanning electron microscopy of pathogenic and non pathogenic Naegleria cysts.
Intern.J.Parasitol., 1974, 4 : 139-142

125. Lastovica, A.J.
Ultrastructure of pathogenic and non pathogenic *Naegleria amoeba*.
Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg., 1975, 69 : 286-287
126. Lépine, P., Cadillon, J., Chaumont, L.
Manuel des inoculations et prélèvements chez les animaux de laboratoire.
Masson & C°, édit., Paris, 1964
127. Lesage, A.
Culture de l'amibe de la dysenterie des pays chauds.
Ann.Inst.Pasteur, 1905, 19 : 9-16
128. Liepinis, A.K., Gel'cer, Ju, G., Cibisova, O.J., Gieptniet, V.A.
Détermination des Protozoaires du sol de la partie européenne de l'U.R.S.S.
Editions "Mintis", Vilno, 1973
129. Maitra, S.C., Krishna-Prasad, B.N., Das, S.R., Agarwala, S.C.
Study of *Naegleria aerobia* by electron microscopy.
Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg., 1974, 68 : 56-60
130. Mac Connell, E.E., Garner, F.M., Kirk, J.H.
Hartmannellosis in a bull.
Path.Veter., 1968, 5 : 1-6
131. Martin, J.J.
Neuropathological study of three cases of primary amoebic meningoencephalitis.
C R. Coll.Intern. sur Méningoencéphalite amibienne primitive et les Amibes libres, Anvers, 1973, pp.81-95
Libr.Prince Léopold, Anvers, B 2000, 1974
132. Martinez, A.J., Nelson, E.C., Jones, M., Duma, R.J., Rosenblum, W.I.
Experimental *Naegleria meningoencephalitis* in mice : an electron microscope study.
Lab.Invest., 1971, 25 : 465-475
133. Martinez, A.J., Nelson, E.C., Duma, R.J.
Animal model : primary amebic (*Naegleria*) meningoencephalitis in mice.
Amer.J.Path., 1973, 73 : 545-548
134. Martinez, A.J., Markowitz, S.M., Duma, R.J.
Experimental pneumonitis and encephalitis caused by *Acanthamoeba* in mice : pathogenesis and ultrastructural features.
J.Infect.Dis., 1975, 131 : 692-699

135. Müller, M.
Lysosomal hydrolases in *Acanthamoeba* sp.
J.Protozool., 1969, 16 : 428-431
136. Musgrave, W.E., Clegg, M.T.
The cultivation and pathogenesis of amoeba.
Phillip.J.Sci., 1906, 1
137. Nagington, J., Watson, P.G., Playfair, T.J., Mac Gill, J.,
Steele, A.D.
Amoebic infection of the eye.
Lancet, 1974, 2 : 1537-1540
138. Neff, R.J.
Purification, axenic cultivation and description
of a soil amoeba, *Acanthamoeba* sp.
J.Protozool., 1957, 4 : 176
139. Nelson, C.E., Jones, M.M.
Culture isolation of agents of primary amebic meningoencephalitis.
J.Parasitol., 1970, 56 (Sect II) : 248
140. Nikoljuk, V.F., Gel'cer, Ju., G.
Les protozoaires du sol en U.R.S.S.
(Texte en russe), Editions "Fan", Tachkent, 1972
141. Noc, F.
Recherches sur la dysenterie amibienne en Cochinchine.
Ann.Inst.Pasteur, 1903, 23 : 177-204
142. Page, F.C.
Taxonomic criteria for limax amoebae, with description of three
new species of *Hartmannella* and three of *Vahlkampfi*.
J.Protozool., 1967, 14 : 499-521
143. Page, F.C.
Filamoeba nolandi, n.gen., n.sp., a filose amoeba.
Trans.Amer.Microsc.Soc., 1967, 86 : 405-411
144. Page, F.C.
Redefinition of the genus *Acanthamoeba*
with descriptions of three species.
J.Protozool., 1967, 14 : 709-724

.../

145. Page, F.C.
Generic criteria for *Flabellula*, *Rugipes* and *Hyalodiscus*,
with descriptions of species.
J. Protozool., 1968, 15 : 9-26
146. Page, F.C.
Hartmannella limax : the original "limax" amoeba ?
Trans. Amer. Microsc. Soc., 1969, 88 : 199-204
147. Page, F.C.
Mitosis and pseudopod formation in *Vexillifera bacillipedes*, n.sp.,
a mayorellid amoeba.
Trans. Amer. Microsc. Soc., 1969, 88 : 394-400
148. Page, F.C.
Platyamoeba stenopodia, n.sp., a fresh-water amoeba.
J. Protozool., 1969, 16 : 437-441
149. Page, F.C.
Mastigamoeba aspera from estuarine tidal pools in Maine.
Trans. Amer. Microsc. Soc., 1970, 89 : 197-200
150. Page, F.C.
Two new species of *Paramoeba* from Maine.
J. Protozool., 1970, 17 : 421-427
151. Page, F.C.
A comparative study of five fresh-water and marine species
of *Thecamoebidae*.
Trans. Amer. Microsc. Soc., 1971, 90 : 157-173
152. Page, F.C.
Two marine species of *Flabellula* (*Amoebida*, *Mayorellidae*).
J. Protozool., 1971, 18 : 37-44
153. Page, F.C.
Rhizamoeba polyura, n.gen., n.sp., and uroidal structures
as a taxonomic criterion for amoebae.
Trans. Amer. Microsc. Soc., 1972, 91 : 502-513
154. Page, F.C.
A study of two *Mayorella* species and proposed union of the families
Mayorellidae and *Paramoebidae* (*Rhizopodea*, *Amoebida*).
Arch. Protistenk., 1972, 114 : 404-420
155. Page, F.C.
Paramoeba : a common marine genus.
Hydrobiol., 1973, 41 : 183-188

156. Page, F.C.
A further study of taxonomic criteria for "limax" amoebae,
with descriptions of new species and a key to genera.
Arch.protistenk, 1974, 116 : 149-184
157. Page, F.C.
Rosculus lithacus Hawes 1963 (Amoebida, Flabellulidae)
and the amphizoic tendency in amoebae.
Acta Protozoologica, 1974, 13 : 143-154
158. Page, F.C.
Some marine *Platyamoeba* of east Anglia.
J.Mar.Biol.Assoc.,(U.K.), 1974, 54 : 651-664
159. Page, F.C.
A new family of amoebae with fine pseudopodia.
Zool.J.Linn.Soc., 1975, 56 : 73-89
160. Page, F.C.
Morphological variation in the cyst wall of *Naegleria gruberi*
(Amoebida, Vahlkampfiidae).
Protistologica, 1975, 11 : 195-204
161. Page, F.C.
A revised classification of the Gymnamoebia (Protozoa, Sarcodina).
Zool.J.Linn.Soc., 1976, 58 : 61-77
162. Pant, K.D., Prassard, B.N., Singh, L.M.
Antigenic relationships among fifteen strains of
pathogenic *Hartmannella*.
Indian J.Exp.Biol., 1968, 6 : 227
163. Patras, D., Andujar, J.J.
Meningoencephalitis due to *Hartmannella* (*Acanthamoeba*)
Amer.J.Clin.Path., 1966, 46 : 226-233
164. Penard, E.
Faune rhizopodique du bassin du Léman.
Editions Kundig, Genève (Suisse), 1902
165. Penard, E.
Notice sur les rhizopodes du Spitzberg.
Arch.Protistenk, 1903, II : 238-282
166. Penard, E.
Notes sur quelques sarcodiniés.
Rev.suisse Zool., 1905, 13 : 585-616

167. Pereira, M., Marsden, M., Corbitt, G., Tobin, J.
 Ryan virus : a possible new human pathogen.
 Brit.Med.J., 1965, 1 : 130-132
168. Phillips, B.P.
 Naegleria : another pathogenic amoeba.
 Studies in germ-free guinea-pigs.
 Amer.J.Trop.Med.Hyg., 1974, 5 : 850-855
169. Pittam, M.D.
 Studies of an amoeba-flagellate Naegleria gruberi.
 Quart.J.Microsc.Sci., 1963, 104 (513) : 29-30
170. Pussard, M.
 La caryocinèse des amibes du genre Acanthamoeba
 (famille des Hartmannellidae).
 C R. Acad.Sci., 1963, 256 : 2695-2697
171. Pussard, M.
 Comportement de la vacuole pulsatile pendant la division cellulaire
 chez les amibes du genre Acanthamoeba (famille des Hartmannellidae).
 C R. Acad.Sci., Paris, 1963, 256 : 5397-5399
172. Pussard, M.
 Cytologie d'une amibe terricole, Acanthamoeba terricola, n.sp.
 Ann.Soc.Nat.Zool., 1964, 6 : 565-600
173. Pussard, M.
 Acanthamoeba comandoni, n.sp. :
 comparaison avec A. terricola Pussard 1964.
 Rev.Ecol.Biol. Sol, 1964, 1 : 587-610
174. Pussard, M.
 Cuticule et caryocinèse de Gocevia fonbrunei, n.sp.
 (Cochliopodiidae, Testacealobosa).
 Arch.Zool.Exp.Gén., 1965, 105 : 101-117
175. Pussard, M.
 Le genre Acanthamoeba Volkonsky 1931 (Hartmannellidae, Amoebida).
 Protistologica, 1966, 2 : 71-93
176. Pussard, M.
 Les protozoaires du sol.
 I. Systématique, techniques d'étude et de numération, importance
 et fluctuations numériques, caractères adaptatifs.
 Ann.Epiphyties, 1967, 18 : 335-360

177. Pussard, M.
Comparaison morphologique de quatre souches d'*Acanthamoeba*
du groupe *astronyxis-comandoni*.
J. Protozool., 1972, 19 : 557-563
178. Pussard, M.
Modalités de la division nucléaire et taxonomie chez les amibes
(*Amoeba*, *Protozoa*). Révision des notions de promitose, mésomitose
et métamitose.
Protistologica, 1973, 9 : 163-173
179. Pussard, M.
Description d'une amibe de type flabellulien,
Pessonnella marginata, n.gen., n.sp., (*Mayorellidae*, *Amoeboae*)
Protistologica, 1973, 9 : 175-185
180. Pussard, M.
La morphologie des amibes libres : intérêt et principes d'étude.
Ann. Soc. belge Méd. trop., 1974, 54 : 249-257
181. Rafalko,
Cytological observations on the amoeba-flagellate,
Naegleria gruberi (*Protozoa*).
J. Morphol., 1947, 81 : 1-44
182. Raizada, M.K., Krishna Murti, G.R.
Change in the activity of certain enzymes
of *Hartmannella* (Culbertson strain A1) during encystment.
J. Protozool., 1971, 18 : 115-119
183. Rastogi, A.K., Sagar, P., Agarwala, S.C.
Changes in the levels of some macromolecules and certain
enzymes activities in excysting *Schizopyrenus russelli*.
J. Protozool., 1971, 18 : 506-509
184. Richards, C.S.
Two new species of *Hartmannella amoebae* infecting
fresh-water mollusks.
J. Protozool., 1968, 15 : 651-656
185. Robert, V.B., Rorke, L.B.
Primary amebic encephalitis probably from *Acanthamoeba*.
Ann. Intern. Med., 1973, 79 : 174-179
186. Rodier, J.
L'analyse de l'eau.
Tome II, 363 pages
Dunod, édit., Paris, 1975

187. Rondanelli, E.G., Carosi, G., Filice, G., De Carneri, I.
Rilievi critici sull'organizzazione ultrastrutturale di un ceppo patogeno (A1 di Culbertson) di *H. castellanii* coltivato in vitro.
Parasitol., 1971, 13 : 339-343
188. De Saedeleer, H.
Recherches sur les pseudopodes des rhizopodes testacés.
Les concepts pseudopodes "filosa", "lobosa", "granuloreticulosa".
Arch.Zool.Exp.Gén., 1932, 74 : 597-626
189. De Saedeleer, H.
Beitrag zur Kenntnis der Rhizopoden.
Mem .Mus.R.Hist.Nat.Bel., 1934, 60 : 112 pages.
190. Sandon, H.
The composition and distribution of the protozoan fauna of the soil.
Oliver & Boyd, publish., London, 1927
191. Saygi, G.
Pathogenic and serological studies of Ryan and Neff strains of *Hartmannella castellanii*.
Trans.Roy.Soc.Trop.Med., 1969, 63 : 11
192. Saygi, G., Warhurst, D.C., Roome, A.
A study of amoebas isolated from the Bristol cases of primary amoebic encephalitis.
Proc.Roy.Soc.Med., 1973, 66 : 277-282
193. Sawyer, T.K., Griffin, J.L.
Acanthamoeba comandoni and *A. astronyxis* : taxonomic characteristics of mitotic nuclei, "centrosomes" and cysts.
J.Protozool., 1971, 18 : 382-388
194. Sawyer, T.K.
Thecamoeba hoffmani, sp.n. (Amoebida, Thecamoebidae) from gills of fingerling salmonid fish.
J.Parasitol., 1974, 60 : 677-682
195. Sawyer, T.K.
A proposed new family : *Acanthamoebidae* n.fam. (order: Amoebida) for certain cyst-forming filose amoebae.
Trans.Amer.Microsc.Soc., 1975, 94 : 93-98

196. Sawyer, T.K.
Marine amoebae from surface waters of Chincoteague Bay, Virginia.
One new genus and eleven new species within the families
Thecamoebidae and Hyalodiscidae.
Trans.Amer.Microsc.Soc., 1975, 94 (3) : 305-323
197. Sawyer, T.K.
Clydonella, n.gen. (Amoebida, Thecamoebidae) proposed to provide
an appropriate generic home for Schaeffer's marine species of
Rugipes, C. vivax (Schaeffer 1926) N.comb.
Trans.Amer.Microsc.Soc., 1975, 94 : 395-400
198. Schaeffer, A.A.
Taxonomy of the amoebae.
Papers Department Marine Biol., Carnegie Inst., Washington, 1926
24 : public. 345
199. Schardinger, F.
Entwicklungskreis einer Amoeba lobosa (Gymnamoeba) : Amoeba gruberi.
Sitzb.Kaiserl.Akad.Wiss.,Wien Abt., 1899, 1(108) : 713-734
200. Schaudinn,
Untersuchungen über die Fortpflanzung der Rhizopoden.
Arb.Kais.Gesundheitsamte, 1903, 19 : 547-576
201. Schuster, F.
An electron microscope study of the amoeba-flagellate Naegleria
gruberi (Schardinger).
I. The amoeboid and flagellate stages.
J.Protozool., 1963, 10 : 297-313
202. Schuster, F.L.
Intranuclear virus-like bodies in Naegleria gruberi.
J.Protozool., 1969, 16 : 724-727
203. Schuster,F.L., Dunnebacke, T.H.
Formation of bodies associated with virus-like particles
in the amoeba-flagellate Naegleria gruberi.
J.Ultrastruct.Res., 1971, 36 : 659-668
204. Schuster, F.L., Dunnebacke, T.H.
Virus-like particles in N. gruberi E.G.Transmission and infectivity
J.Protozool., 1971, 18(Suppl.) : 21
205. Schuster, F.L.
Ultrastructure of cysts of Naegleria sp. : a comparative study.
J.Protozool., 1975, 22 : 352-359

.../

206. Sen, A., Mukerjee, B., Ray, I.C.
Observations on the antigenic make-up of amoebae.
Ann.Biochem.Exper.Med., 1961, 21 : 323-326
207. Siddiqui, W., Balamuth, W.
Serological comparison of selected parasitic and free-living amoebae in vitro using diffusion-precipitation and fluorescent-antibody technics.
J.Protozool., 1965, 13 : 175-182
208. Singh, B.N.
Selectivity in bacterial food by soil amoebae :
in pure mixed culture and in sterilized soil.
Ann.Appl.Biol., 1941, 28 : 52-64
209. Singh, B.N.
Selection of bacterial food by soil flagellates and amoebae.
Ann.Appl.Biol., 1942, 29 : 18
210. Singh, B.N.
The selection of bacterial food by soil amoebae and
the toxic effects of bacterial pigments and other products
on soil protozoa.
Brit.J.Exp.Path., 1945, 26 : 316-325
211. Singh, B.N.
A method of estimating the members of soil Protozoa, especially
amoebae, based on their differential feeding on bacteria.
Ann.Appl.Biol., 1946, 33 : 112-119
212. Singh, B.N.
A culture method for growing small free-living amoebae
for the study of their nuclear division.
Nature, 1950, 165 : 65-66
213. Singh, B.N.
Nuclear division in amoebae and its bearing on classification.
Nature, 1951, 167 : 582-584

214. Singh, B.N.
Nuclear division in nine species of small free-living amoebae and its bearing on the classification of the order Amoebida.
Phil.Trans.Roy.Soc., London, 1952, (B) 236 : 405-461
215. Singh, B.N., Mathew, S., Anand, N.
The role of *Aerobacter* sp., *Escherichia coli* and certain amino-acids in the encystment of *Schizopyrenus russelli*.
J.Gen.Microbiol., 1958, 19 : 104-111
216. Singh, B.N., Das, S.R.
Studies on pathogenic small free-living amoebae and the bearing of nuclear division on the classification on the order Amoebida.
Phil.Trans.Roy.Soc., London, 1970, (B) 259 : 435-475
217. Singh, B.N., Tripta Datta, Dutta, G.P.
Factors inducing excystation in free-living amoebae.
Indian J.Exper.Biol., 1971, 9 : 350-357
218. Singh, B.N., Das, S.R.
Occurrence of pathogenic *Naegleria aerobia*, *H. culbertsoni* and *H. rhysodes* in sewage sludge samples of Lucknow.
Current Sci., 1972, 41 : 277-281
219. Singh, B.N.
Classification of amoebae belonging to the order Amoebida, with special reference to pathogenic free-living forms.
Current Sci., 1972, 41 : 395-403
220. Singh, B.N., Das, S.R.
Intranasal infection of mice with flagellate stage of *Naegleria aerobia* and its bearing on the epidemiology of human meningo-encephalitis.
Current Sci., 1972, 41 : 625-628
221. Singh, L.M., Singh, B.N.
Antigenic difference in free-living and parasitic amoebae as revealed by immobilization reaction.
Indian J.Exper.Biol., 1966, 4 : 49-50
222. Skocil, V., Cerva, L., Serbus, C.
Epidemiological study of amoebae of limax group in military communities.
First report.
J.Hyg.epidem., Praha, 1970, 14 : 61-66

223. Skocil, V., Cerva, L., Serbus, C., Nejedlo, V.
Epidemiological study of amoebae of limax group in military communities.
II. Study of the military community (1968-1969)
J.Hyg.Epidemiol., Praha, 1970, 14 : 324-331
224. Skocil, V., Serbus, C. Cerva, L.
Epidemiological study of incidence of amoebae of the limax group in military communities.
III. Investigation of the community of 3rd Garrison L :
1. Problems of contagion in the community.
J.Hyg.Epidemiol., Praha, 1971, 15 : 156-162
225. Skocil, V., Cerva, L., Serbus, C.
Epidemiological study of amoebae of the limax group in military communities.
IV. Relation between the finding of amoebae in the external environment and their incidence in the soldiers during the investigation into the community.
J.Hyg.Epidem., Praha, 1971, 15 : 445-449
226. Skocil, V., Dvorak, R., Sterba, J., Slajs, J., Serbus, C., Cerva, L.
Epidemiological study of amoebae of the limax group in military communities.
V. Relation between the presence of amoebae of the limax group in nasal swabs and a pathological finding in nasal mucosa.
J.Hyg.Epidem., Praha, 1972, 16 : 101-105
227. Skocil, V., Serbus, C., Cerva, L.
Epidemiological of the incidence of amoebae of the limax group in military communities.
VI. Relation between the finding of amoebae of the limax group in nasal swabs and some epidemiologic indices.
J.Hyg.Epidemiol., Praha, 1972, 16 : 226-230
228. Sotelo-Avila, C., Taylor, F.M., Ewing, C.W.
Primary amebic meningoencephalitis in a healthy 7 years-old boy.
J.Pediat.,USA, 1974, 85 (1) : 131-136
229. Sprague, V., Beckett, R.L.
A disease of blue crabs (*Callinectes sapidus*) in Maryland and Virginia.
J.Invert.Path., 1966, 8 : 287-289
230. Sprague, V.
The nature of the etiological agent of "gray crab" disease.
J.Invert.Path., 1966, 11 : 503

231. Sprague, V., Beckett, R.L., Sawyer, T.K.
A new species of *Paramoeba* (Amoebida, Paramoebidae),
parasitic in the crab *Callinectes sapidus*.
J.Invert.Path., 1969, 14 : 167-174
232. Stamm, W.P.
The staining of free-living amoebae by indirect immunofluorescence.
CR. Coll.Intern. sur la Méningoencéphalite amibienne primitive
et les Amibes libres, Anvers, 1973, pp. 97-101
Libr.Prince Léopold, Anvers, B 2000, 1974
233. Stevens, A.R., O'Dell, W.D.
In vitro growth and virulence of *Acanthamoeba*.
J.Parasitol., USA, 1974, 60(5) : 884-885
234. Symmers, W.S.T.C.
Primary amoebic meningoencephalitis in Britain.
Brit.Med.J., 1969, 4 : 449-454
235. Tregouboff, G.
Classe des Héliozoaires Haeckel 1866
In : P. Grassé : "Traité de Zoologie", pp. 437-489.1,(2).
Masson & Co, édit., Paris, 1953
236. Vandepitte, J., Van Den Driesche, E., Van Dijck, P.J.,
De Jonckheere, J.
A new case of primary amoebic meningoencephalitis
observed in Belgium.
CR. Coll.Intern. sur la Méningoencéphalite amibienne primitive
et sur les Amibes libres, Anvers, 1973, pp. 73-79
237. Vickerman, K.
Patterns of cellular organization in *limax amoeba*.
An electron microscope study.
Exper.Cell.Res., 1962, 26 : 497-519
238. Visvesvara, G.S., Callaway, C.S.
Light and electron microscopic observations on the pathogenesis
of *Naegleria fowleri* in mouse brain and tissue culture.
J.Protozool., 1974, 21 : 239-250
239. Visvesvara, G.S., Healy, G.R.
Biologic and serologic characterization of the 161A strain
of *Naegleria fowleri*.
Health Labor.Sci., 1975, 12 : 8-11

240. Visvesvara, G.S., Balamuth, W.
Comparative studies on related free-living and pathogenic amoebae, with special reference to *Acanthamoeba*.
J. Protozool., 1975, 22 : 245-256
241. Volkonsky, M.
Hartmannella castellanii Douglas
et classification des Hartmannelles.
Arch. Zool. Exp. Gén., 1931, 72 : 217-339
242. Walker, E.
The parasitic amoebae of the intestinal tract of man and other animals.
J. Med. Res., 1908, 17 : 379-459
243. Wang, S.S., Feldman, H.A.
Isolation of *Hartmannella* species in human throats.
New Engl. J. Med., 1967, 277 : 1174-1179
244. Warhurst, D., Armstrong, J.
A study of a small amoeba from mammalian cell-cultures infected with Ryan virus.
J. Gen. Microbiol., 1968, 50 : 207-215
245. Willaert, E.
Isolement et culture in vitro des amibes du genre *Naegleria*.
Ann. Soc. belge Méd. trop., 1971, 51 : 701-708
246. Willaert, E.
Structures immunochimiques comparées d'amibes du genre *Naegleria*.
Protistologica, 1972, 8 : 497-504
247. Willaert, E., Le Ray, D.
Caractères morphologiques, biologiques et immunochimiques de *Naegleria jadini*, sp. nov. (Amoebida, Vahlkampfiidae).
Protistologica, 1973, 9 : 417-426
248. Willaert, E., Jamieson, A., Jadin, J.B., Anderson, K.
Epidemiological and immunoelectrophoretic studies on human and environmental strains of *Naegleria fowleri*.
Ann. Soc. belge Méd. trop., 1974, 54 : 333-342
249. Willaert, E.
Etude immunotaxonomique du genre *Naegleria*.
Ann. Soc. belge Méd. trop., 1974, 54 : 395-404

250. Willaert, E.
Etude immunotaxonomique des genres *Naegleria* et *Acanthamoeba*
(Protozoa, Amoebida).
Thèse Doctorat ès Sciences, Lille, 1975, 240 pages
251. Wolff, E.
Le comportement et le rôle de la vacuole contractile
d'une amibe d'eau douce.
C.R. Acad.Sci., 1927, 185 : 678-679
252. Wong, M.M., Karr, S.L. jr., Balamuth, W.B.
Experimental infections with pathogenic free-living
amoebae in laboratory Primate host I(A).
A study of susceptibility to *Naegleria fowleri*.
J.Parasitol.,USA, 1975, 61 (2) : 199-208
253. Wong, M.M., Karr, S.L. jr., Balamuth, W.B.
Experimental infections with pathogenic free-living
amoebae in laboratory Primate host I(B).
A study on susceptibility to *Acanthamoeba culbertsoni*.
J.Parasitol.,USA, 1975, 61 (4) : 682-690
254. Zuelzer, M.
Über *Amoeba bidulphiae*, n.sp., eine der marinen Diatomee
Biddulphia sinensis Grev., parasitierende Amoebe.
Arch.Protistenk., 1927, 57 : 247-289

Table des Matières

	<u>Page /</u>
Introduction.	1.
Chapitre I.	
Aperçu général sur la Méningoencéphalite amibienne primitive (M.E.A.P.).	
Historique	3.
Le syndrome de la M.E.A.P.	
A. M.E.A.P. dues à <i>Naegleria fowleri</i>	5.
B. M.E.A.P. dues aux <i>Acanthamoeba</i> et <i>Hartmannella</i>	9.
Autres rôles pathogènes des amibes libres chez l'homme et l'animal	10.
Prophylaxie	13.
Chapitre II.	
Généralités sur les amibes libres.	
Méthodes de culture	17.
A. Culture avec aliment bactérien figuré	-
B. Culture axénique	19.
Méthodes d'étude	
A. Etude des caractères morphologiques et cytologiques	21;
B. Etude des caractères biochimiques et immunochimiques	26.
Etude des amibes libres en microcultures par microscopie en contraste de phase	32.
A. Physionomie amibienne	33.
Figure 1.	34.
B. Morphologie	36.
Planche I.	42-43.
C. Division	45.
Figure 3.	47.
Promitose	48.
Mésomitose	50.
Métamitose	-
Discussion	51.
Eléments de base de systématique amibienne	55.

.../

Chapitre II.

Travaux personnels.

Moyens d'étude

A. Méthodes pour l'étude qualitative des amibes	63.
Tableau I. Table de Rodier utilisée	70.
B. Protocole pour l'étude quantitative de la présence d'amibes	71.
C. Protocole pour l'étude de la pathogénicité des amibes libres	72.

Résultats globaux

Tableau II.	74.
A. Positivité des prélèvements	75.
B. Dénombrement et recensement des souches	-
C. Dénomination provisoire des souches isolées	77.

Tableau III. et Tableau IV.

Nombre de souches isolées en fonction des prélèvements^{ts} 78-79.

Tableau V.

Distribution des souches en fonction des genres
et des prélèvements positifs 80.

D. Fréquence et abondance des souches pour chaque Genre	81.
--	-----

Tableau VI. 82.

E. Approche quantitative	85.
--------------------------	-----

Tableau VII. 86.

Etude du pouvoir pathogène de quelques souches d'Acanthamoeba
isolées de piscines. 89.

A. Les espèces du genre Acanthamoeba	-
--------------------------------------	---

Planche II. 92-93.

B. Etude du pouvoir pathogène des souches isolées	95.
--	-----

Tableau IX. Résultats des tests de patho- génicité des souches Acanthamoeba isolées	97.
--	-----

Planche III. Acanthamoeba pathogènes Anatomopathologie expérimentale	100-101
---	---------

.../

Observations de souches de la famille
des Vahlkampfiidae Jollos 1917, Zulueta 1917

A. Les souches de Naegleria	107.
Morphologie cellulaire	
Kystes	
Promitose	
Planche IV. N. gruberi	112-113
B Les souches de Vahlkampfia	115.
Planche V. Souche référence V. avara Page 1967	117.
Les formes végétatives	
Les kystes	
Tableaux XI & XII. Mesures	120-121
Division	
Planches VI. à XII. souches isolées	pp. 127 à 153

Observations de différents modes mitotiques
chez des amibes de type "flabellulien"

A. Division par métamitose	
chez des souches d'aspect flabellulien	155.
Planche XIII.	158-159
Planche XIV. Ibid. et <i>Platyamoeba stenopodia</i>	162-163
B. Division par mésomitose	
chez des amibes de type flabellulien	166.
Figure 4. Mitose de <i>Vannella platyamoeba</i> (Page)	169.
Diagnose du Genre <i>Vannella</i>	-
Planches XV. & XVI. <i>Vannella</i> sp. isolées	171
	& 173

.../

Observations d'une amibe du genre *Vexillifera* sp. (Paramoebidae)

A. Description	180.
Caractères généraux	
Dimensions	
Morphologie	
Division cellulaire	182.
B. Discussion	183.
Planche XVII.	185.

Observations d'une amibe à pseudopodes type "filosa" :

Nuclearia simplex Cienkowski 1865

(Protozoa, Rhizopodea, Filosia, Aconchulinida)

A. Description	189.
Caractères généraux	
Dimensions	
Morphologie cellulaire	
Kyste	
Planche XVIII.	195.
Division cellulaire	197.
Planche XIX.	201.
B. Discussion	203
Diagnose de <i>Nuclearia simplex</i>	205.
	& 206.

.../

Observation d'une nouvelle espèce,

Comandonia operculata, n.g., n.sp. (Acanthamoebidae)

A. Description	207.
Caractères généraux	-
Dimensions	208.
Morphologie cellulaire	-
Morphologie kystique	211.
Tableau XII. diamètre moyen des kystes	213.
B. Discussion	Division par métamitose -
Planche XX. Souche LU ₅ c. <i>Comandonia operculata</i>	221.
Diagnose du genre <i>Comandonia</i> et de l'espèce-type	225 - 226

Conclusions	227.
-------------	------

Annexe I. Milieux de culture des amibes libres	229.
--	------

Bibliographie (255 références dont une 76 bis)	231.
---	------

Table des Matières

★ La "typographie", la présentation du texte et la mise en page de la totalité de cette Thèse de Doctorat d'Etat ont été effectuées sous la seule responsabilité de Mle J. Conil, secrétaire médicale technique de l'Education Nationale, en collaboration avec l'auteur, qui l'a autorisée à insérer cette Note.

I. C. VAUBECOUR
l'Imprimerie des étudiants lyonnais
11 et 13 Rue Vaubecour
LYON 69002 - Tél. 42 - 45 - 85

